



FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR Y AMBIENTALES
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA



SELECCIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES COMO INHIBIDORES DE BACTERIAS PATÓGENAS DE PECES Y UTILIZACIÓN EN ACUICULTURA

Jorge García Márquez

Puerto Real a 29 de enero de 2018

TRABAJO FIN DE MÁSTER (PERFIL INVESTIGADOR)
MASTER ACUICULTURA Y PESCA

SELECCIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES COMO INHIBIDORES DE BACTERIAS PATÓGENAS DE PECES Y UTILIZACIÓN EN ACUICULTURA

Memoria presentada por Jorge García Márquez para la obtención del
Título de Máster en Acuicultura y Pesca
(Perfil Investigador)

Fdo.: Jorge García Márquez
Puerto Real a 29 de enero de 2018

TRABAJO FIN DE MÁSTER (PERFIL INVESTIGADOR)
MASTER ACUICULTURA Y PESCA

Dr. Salvador Arijó Andrade, Profesor Contratado Doctor del Departamento de Microbiología de la Universidad de Málaga, y **Dr. Juan Miguel Mancera Romero**, Catedrático de Zoología de la Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales de la Universidad de Cádiz, como Directores del Trabajo Fin de Máster titulado **“Selección de extractos vegetales como inhibidores de bacterias patógenas de peces y utilización en acuicultura”** realizado por D. Jorge García Márquez.

INFORMAN:

Que el trabajo realizado en la presente Memoria se ha llevado a cabo bajo su dirección en las dependencias del Departamento de Microbiología de la Universidad de Málaga.

Y para que así conste firman el presente Trabajo Fin de Máster en Puerto Real (Cádiz) a 29 de enero de 2018.

Firma del Tutor

Firma del Tutor

Fdo.: Dr. Salvador Arijó Andrade
Profesor Contratado Doctor de la UMA

Fdo.: Dr. Juan Miguel Mancera
Catedrático de Zoología de la UCA

TRABAJO FIN DE MÁSTER (PERFIL INVESTIGADOR)
MASTER ACUICULTURA Y PESCA

AGRADECIMIENTOS

Se acaba un periodo de aprendizaje, de horas y horas en el laboratorio que por fin dan sus frutos. Aquí está el resultado de todo el trabajo realizado y quiero mostrar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible que llegue a este punto.

En primer lugar, a mi director, tutor e incluso diría que amigo, el Dr. Salvador Arijó Andrade, por darme la oportunidad hace ya dos años de realizar un trabajo de iniciación a la investigación (aunque fuese un TFG bibliográfico), que hizo en parte que me decantase por realizar este máster. Todo este tiempo a tu lado me ha permitido adquirir una gran experiencia profesional y personal. Asimismo, quiero agradecer su paciencia y su completa disponibilidad para discutir aspectos técnicos y formales de la redacción del trabajo. Ojalá que podamos seguir trabajando juntos en próximos proyectos.

En segundo lugar, agradecer a mi director, el Dr. Juan Miguel Mancera, por la oportunidad de hacer este trabajo con él, y por estar siempre disponible, aunque en la distancia, para cualquier cosa. Espero que nos volvamos a ver pronto.

A mis queridos compañeros del Lab3, gracias Silvana por estar siempre para todo. Gracias Patri, Marta y Milena por tantas horas juntos en el laboratorio, recordaré siempre los momentos y las risas que compartimos. También quiero mencionar a los compañeros que fueron llegando y saliendo del laboratorio, de todos me llevo cosas, en especial de esos tres meses hablando inglés con Mouna.

A mis compañeros del máster, quiero daros las gracias por sentirme tan integrado desde el primer momento. No es fácil salir de tu ciudad, de tu zona de confort, y encontrarte de golpe con veinte personas que no conoces y con las que vas a compartir si o si todo un año. Gracias por los buenos (y algunos malos) ratos que hemos compartido. Gracias por ayudarme a darle a cada día su propia sonrisa, su propio gozo, su propio afán.

Quiero hacer un alto en vosotros, usuarios del Ropero (no en vano soy el Director del Área de Comunicación y Atención al Cliente, y socio capitalista al 10%). La vida nos

concede a cada uno de nosotros unos escasos momentos de pura felicidad. La protagonista de una antigua comedia (¡no podía no poner una cita!) decía que todos tenemos un momento de oro en que se nos concede la felicidad. Luego la felicidad se va transformando en otras cosas: las notas de los hijos, un crucero, un éxito, quién sabe. Pero el momento de oro no vuelve más. El recuerdo de esos momentos nos acompaña para siempre y se transforma en el lugar de la memoria al que tratamos de regresar durante el resto de nuestra vida.

Alguno de vosotros me preguntó que por qué escribía. Por placer, por evadirme, respondí. La verdad es que escribo para recordar las cosas como yo quiero. Para recordar mejor. Para recordaros mejor. Añoraremos esos momentos que, irremediablemente, pasaron para siempre, sin que nosotros notásemos que se nos pasaban, teniendo a nuestro lado a esa delicada y discreta pasajera que es la felicidad, cuya presencia sólo percibimos por el hueco que deja al marcharse.

Ahora va a empezar para nosotros una nueva etapa. Una nueva etapa. Son palabras mayores. El ser humano no tiene una vida muy larga. Por eso tenemos la necesidad de parcelar la vida, de trocearla, de marcarla con muescas, hitos, recordatorios, metas. Como si fuera tan inmensa que no pudiéramos mirarla, ni comprenderla entera.

Hablamos con indiferencia de horas, de días, de semanas, de meses. Cuando hablamos de años nos ponemos más serios. Cumplimos etapas. Nos alegramos que el abrir una etapa nos ofrezca su pequeña caja de sorpresas, porque eso quiere decir que estamos vivos. A pesar de que la caja esté vacía y seamos nosotros los que debemos tomarnos el trabajo de llenarla de cosas. De cosas confusas: un paseo por un jardín, dos o tres atardeceres, algún baño en la playa, una compañera de piso o una vecina de rellano, unas manos entrelazadas, un paisaje inolvidable, cierta música, una gráfica, un rincón (llamémosle un Roper) donde reír, el olor a queso de alguna feria, un beso a la orilla del mar... Porque la vida es única. Es sencillamente lo único que tenemos. Y cada año, cada etapa, viene con el regalo de su pequeña cajita vacía.

Mañana comenzamos otra etapa. Ignoramos qué es lo que vamos a empezar. Aquí ya estamos en el pasado: ahora toca continuar y empezar a buscar nuevas oportunidades.

Desde mañana nos haremos a la dura costumbre del olvido. Vendrá conmigo el recuerdo, y yo, con vosotros, amigos. Gracias.

A todos los que estuvieron cuando necesitaba apoyo y a los que continúan. A Virginia y Beatriz, las mejores compañeras de piso que he tenido nunca. A Javi, Nuria, Marina y Pancho, por encerrarme en un coche hasta las 2 de la mañana y hacerme ver que salir de tu zona de confort era necesario en mi vida. Eternamente agradecido a vosotros *chochetes*. A los demás que seguro dejo en el tintero, gracias a todos porque ha sido un año muy duro y os necesitaba.

Y, por último, y precisamente por ello, los más importantes, a mis padres –Antonio y Marta-, a mi hermano Carlos, y a mi familia en general quiero pedirlos perdón y daros las gracias. Por un lado pedirlos perdón por no haber estado con vosotros todo el tiempo que me hubiera gustado. Y por otro, daros las gracias por guiarme, por estar siempre ahí en las buenas y en las malas, porque sin vosotros nada de esto tiene sentido, y por ayudarme a concluir con este trabajo una etapa de mi vida que nunca olvidaré. Gracias, gracias y gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Situación de la pesca y la acuicultura	1
1.2. Desarrollo sostenible, acuicultura ecológica, seguridad alimenticia y control de enfermedades.....	2
1.3. Enfermedades infecciosas en los peces de acuicultura	3
1.3.1. Causadas por hongos	3
1.3.2. Causadas por virus.....	4
1.3.3. Causadas por parásitos.....	4
1.3.4. Causadas por bacterias	4
1.4. Impactos derivados del uso de quimioterápicos.....	6
1.5. Resistencia a los antimicrobianos	7
1.6. Alternativas de bajo impacto ambiental para el tratamiento de enfermedades infecciosas	9
1.6.1. Inmunoestimulantes	9
1.6.2. Bacteriófagos.....	10
1.6.3. Probióticos.....	10
1.6.4. Vacunas	10
1.6.5. Terapias de inhibición del crecimiento, de la replicación y de la expresión de genes de virulencia	11
1.6.6. Sustancias naturales	12
1.7. Extractos de plantas como antimicrobianos	13
1.7.1. Toxicidad.....	14
1.7.2. Administración	15
1.7.2.1. Formas de administración	15
1.7.2.2. Rutas de administración	18
1.7.2.3. Dosis.....	18
1.8. Hipótesis y objetivos.....	19
2. MATERIAL Y MÉTODOS	20
2.1. Extractos utilizados y bacterias de ensayo	20
2.1.1. Extractos utilizados.....	20
2.1.2. Bacterias de ensayo.....	20

2.2. Preparación de los extractos de plantas, aceites, algas y cianobacterias.....	21
2.2.1. Preparación de los extractos de plantas y aceites	21
2.2.2. Preparación de los extractos de algas y de la cianobacteria	21
2.3. Capacidad inhibitoria del crecimiento bacteriano de los extractos.....	21
2.4. Detección de toxicidad de las sustancias ensayadas mediante la observación de inhibición de la bioluminiscencia de <i>V. fischeri</i>	23
2.5. Detección de actividad <i>quorum quenching</i> de las sustancias ensayadas	25
2.6. Estabilidad de las sustancias a distintas temperaturas y tiempos de almacenaje	27
2.7. Estabilidad de las sustancias al ser adicionadas al pienso	28
3. RESULTADOS	29
3.1. Capacidad inhibitoria del crecimiento bacteriano de los extractos.....	29
3.2. Capacidad de inhibición de la bioluminiscencia de <i>V. fischeri</i>	32
3.2.1. Inhibición de la bioluminiscencia en presencia de aceite de aloesia.....	32
3.2.2. Inhibición de la bioluminiscencia en presencia de aceite de clavo.....	33
3.2.3. Inhibición de la bioluminiscencia en presencia de ajo.....	34
3.2.4. Inhibición de la bioluminiscencia en presencia de aceite del árbol del té	35
3.2.5. Inhibición de la bioluminiscencia en presencia de aceite de citronella.....	36
3.3. Detección de actividad <i>quorum quenching</i> de las sustancias ensayadas	37
3.4. Estabilidad de las sustancias a distintas temperaturas y tiempos de almacenaje	39
3.5. Estabilidad de las sustancias al ser adicionadas al pienso	40
4. DISCUSIÓN.....	41
4.1. Capacidad inhibitoria del crecimiento bacteriano de los extractos.....	42
4.2. Capacidad de inhibición de la bioluminiscencia de <i>V. fischeri</i>	44
4.3. Detección de actividad <i>quorum quenching</i> de las sustancias ensayadas	45
4.4. Estabilidad de las sustancias a distintas temperaturas y tiempos de almacenaje	46
4.5. Estabilidad de las sustancias al ser adicionadas al pienso	47
4.6. Futuras líneas de investigación	49
5. CONCLUSIONES.....	50
6. BIBLIOGRAFÍA.....	51

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Generación de alicina en el ajo	15
Figura 2. Halos de inhibición producidos por las sustancias ensayadas	32
Figura 3. Porcentaje de extinción de luminiscencia de <i>V. fischeri</i> a concentraciones crecientes de aceite de aloysia.....	33
Figura 4. Porcentaje de extinción de luminiscencia de <i>V. fischeri</i> a concentraciones crecientes de aceite de clavo	34
Figura 5. Porcentaje de extinción de luminiscencia de <i>V. fischeri</i> a concentraciones crecientes de ajo.....	35
Figura 6. Porcentaje de extinción de luminiscencia de <i>V. fischeri</i> a concentraciones crecientes de aceite del árbol del té	36
Figura 7. Porcentaje de extinción de luminiscencia de <i>V. fischeri</i> a concentraciones crecientes de aceite de clavo	37
Figura 8. Efecto <i>quorum quenching</i> por parte de las sustancias ensayadas	38

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Datos de producción acuícola y pesquera con último registro en 2014.....	1
Tabla 2. Diferentes clases de antibióticos utilizados en la acuicultura, su importancia para la medicina humana y ejemplos de bacterias patógenas multirresistentes aisladas de instalaciones acuícolas	8
Tabla 3. Inhibición del crecimiento bacteriano por el método de pocillos (sustancias suspendidas en solución salina)	30
Tabla 4. Inhibición del crecimiento bacteriano usando discos de papel (sustancias disueltas en etanol)	31
Tabla 5. Inhibición del <i>quorum sensing</i> por parte de las sustancias ensayadas y comparación con los datos obtenidos de inhibición del crecimiento bacteriano y con los ensayos de inhibición de la bioluminiscencia de <i>V. fischeri</i>	38
Tabla 6. Recuento de unidades formadoras de colonias de <i>V. fischeri</i> en presencia de distintas concentraciones de las sustancias ensayadas y comparación con los datos obtenidos de la inhibición del <i>quorum sensing</i> y del crecimiento de <i>V. fischeri</i>	38
Tabla 7. Inhibición por el ajo, almacenado durante 1, 3 y 7 días a distintas temperaturas, sobre <i>V. fischeri</i>	39
Tabla 8. Inhibición del aceite de clavo, almacenado durante 1, 3 y 7 días a distintas temperaturas, sobre <i>V. fischeri</i>	40
Tabla 9. Inhibición del crecimiento bacteriano y de la bioluminiscencia de <i>V. fischeri</i> por parte de las sustancias ensayadas tras ser adicionadas al pienso.....	40

ABREVIATURAS UTILIZADAS

AHL: acil-homoserina lactona

CL50: concentración letal 50

CMI: concentración mínima inhibitoria

D.O.: densidad óptica

EC100: concentración efectiva 100

EC50: concentración efectiva 50

FMN: flavin mononucleótido

FMNH₂: riboflavin mononucleótido reducido

LB: Luria Bertani

LMR: límite máximo de residuos

MAS: motile Aeromonas septicemia

OMS: organización mundial de la salud

OTC: oxitetraciclina

PHB: poli-β-hidroxibutirato

SUE: síndrome ulcerante epizoótico

TSAs: agar de soja tripticasa salino

TSBs: caldo de soja tripticasa salino

UFC: unidades formadoras de colonias

ABSTRACT

The abusive use of antibiotics in aquaculture produces a negative impact on the environment, in addition to generating antibiotic-resistant pathogens. In this way, to minimize the effects of these chemotherapeutics on farmed fish, the environment and the consumers, other alternative therapies have been evaluated, including the use of plant extracts with antimicrobial capacity. The aim of this study was the evaluation of the antimicrobial potential of some natural substances as method of control of bacterial diseases in aquaculture. A first selection of substances was made based on their ability to inhibit three fish pathogens: *Vibrio harveyi*, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and *Aeromonas hydrophila*. The potential toxicity of the substances was calculated by the observation of the decrease of the bioluminescence of *Vibrio fischeri*, being the clove oil the most toxic substance, with an effective concentration 50 (EC50) of 0.059 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Afterwards, the ability of the substances to interfere the mechanism of *quorum sensing*, by which some pathogenic bacteria coordinate the expression of virulence factors, was determined. Results showed that, except the lemongrass oil, all of the tested substances had the capacity to inhibit the *quorum sensing*.

After these selective processes, garlic and clove oil were chosen to continue with the trials. Viability assays were carried out to see if they kept their antimicrobial properties after the extraction and storage processes at 63, 37, 22 and 4 °C during 1, 3 and 7 days. Garlic decreased its antimicrobial capacity over time, and at 63 °C it lost its inhibitory ability from the third day. There was no variation in the stability of the clove oil over time at different storage temperatures. Also garlic and clove oil were added to the feed diets of fishes, to check if in this mix they could lose their antimicrobial properties. Results showed that, at a concentration of 20 mg mL^{-1} of garlic, and 40, 20 and 10 $\mu\text{L mL}^{-1}$ of clove oil, they remain the capacity to inhibit the bacterial growth and the bioluminescence of *V. fischeri*.

In summary, the substances tested in the *in vitro* assays have antimicrobial activity, although it is necessary to carry out *in vivo* trials with fish to check if the antimicrobial

potential of the substances is maintained without generating adverse effects to the fish.

Keywords: Aquaculture, antimicrobials, plant extracts, garlic, clove oil.

RESUMEN

El uso abusivo de antibióticos en la acuicultura produce un impacto negativo en el medio ambiente, además de generar patógenos resistentes a los antibióticos. En este sentido, y para minimizar los efectos de estos quimioterápicos sobre los peces cultivados, el medio ambiente y los consumidores, se han evaluado otras terapias alternativas, entre las que se encuentra el uso de extractos de plantas con capacidad antimicrobiana. El objetivo del presente estudio consistió en evaluar el potencial antimicrobiano de algunas sustancias naturales, como método de control de enfermedades bacterianas en la acuicultura. Se realizó una primera selección de sustancias en base a su capacidad de inhibición de tres patógenos de peces: *Vibrio harveyi*, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* y *Aeromonas hydrophila*. Seguidamente se calculó la toxicidad potencial de las sustancias mediante la observación de la disminución de la bioluminiscencia de *Vibrio fischeri*, siendo el aceite de clavo la sustancia más tóxica, con una concentración efectiva 50 (EC50) de 0,059 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Posteriormente se determinó la capacidad de las sustancias de interferir el fenómeno *quorum sensing*, por la que algunas bacterias patógenas coordinan la expresión de ciertos factores de virulencia. Los resultados obtenidos mostraron que, excepto el aceite de citronella, todas las sustancias ensayadas tuvieron capacidad de inhibición del *quorum sensing*.

Tras estos procesos selectivos se eligió seguir con los ensayos con el ajo y el aceite de clavo. Para conocer si mantenían sus propiedades antimicrobiana tras los procesos de extracción y almacenamiento, se realizaron ensayos de viabilidad a distintas temperaturas (63, 37, 22 y 4 °C) y tiempos de almacenamiento (1, 3 y 7 días). El ajo disminuyó su capacidad antimicrobiana con el tiempo, y a 63 °C perdió su capacidad inhibitoria a partir del tercer día. No se observó variación en la estabilidad del aceite de clavo a lo largo del tiempo en las distintas temperaturas de almacenaje. También se añadió el ajo y el aceite de clavo los piensos de los peces, para comprobar si esta mezcla hacía perder sus propiedades antimicrobianas. Los resultados mostraron que, a una concentración de 20 mg mL^{-1} de ajo y de 40, 20 y 10 $\mu\text{L mL}^{-1}$ de aceite de clavo, las sustancias conservaban su capacidad de inhibición del crecimiento bacteriano y de la bioluminiscencia de *V. fischeri*.

En resumen, las sustancias ensayadas en experimentos *in vitro* poseen actividad antimicrobiana, aunque se hace necesario realizar experimentos *in vivo* con peces para comprobar si el potencial antimicrobiano de las sustancias se mantiene sin generar efectos adversos en los peces.

Palabras clave: Acuicultura, antimicrobianos, extractos de plantas, ajo, aceite de clavo.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Situación de la pesca y la acuicultura

La acuicultura se mantiene como uno de los sectores de producción de alimentos de más rápido crecimiento. En 2014 la producción acuícola mundial alcanzó un nuevo máximo histórico de 73,8 millones de toneladas de peces (Tabla 1), lo que representa el 44,1 % de la producción total de la pesca y la acuicultura. Asimismo, proporciona la mitad de todo el pescado destinado al consumo humano, que en 2014 alcanzó un máximo histórico de 20 kg *per capita* (FAO, 2016).

Tabla 1. Datos de producción acuícola y pesquera con último registro en 2014 (millones de toneladas) (Elaboración propia a partir de datos de FAO, 2016).

	2009	2010	2011	2012	2013	2014
PRODUCCIÓN						
Pesca de captura						
Continental	10,5	11,3	11,1	11,6	11,7	11,9
Marina	79,7	77,9	82,6	79,7	81,0	81,5
Pesca de Captura total	90,2	89,1	93,7	91,3	92,7	93,4
Acuicultura						
Continental	34,3	36,9	38,6	42,0	44,8	47,1
Marina	21,4	22,1	23,2	24,4	25,5	26,7
Total de la Acuicultura	55,7	59,0	61,8	66,5	70,3	73,8
Producción Pesquera Mundial Total	145,9	148,1	155,5	157,8	162,9	167,2
UTILIZACIÓN						
Consumo humano	123,8	128,1	130,8	136,9	141,5	146,3
Usos no alimentarios	22,0	20,0	24,7	20,9	21,4	20,9
Suministro per cápita de pescado por persona (kg)	18,1	18,5	18,6	19,3	19,7	20,1

A su vez, los consumidores exigen la aplicación de normas de calidad cada vez más estrictas, así como garantías de que el pescado que compran se produce de forma sostenible. En el futuro, los precios pueden estar determinados no solo por los piensos, sino también por la introducción de normas más rigurosas sobre el medio ambiente, sobre la calidad, inocuidad y trazabilidad de los alimentos, así como sobre la salud y el bienestar de los animales (FAO, 2016).

1.2 Desarrollo sostenible, acuicultura ecológica, seguridad alimenticia y control de enfermedades

En base a estas exigencias, la estrategia de la Comisión Europea, en el contexto de las Estrategias Europeas para el Desarrollo Sostenible de la Acuicultura Marina, tiene por objeto garantizar una industria acuícola respetuosa con el medio ambiente y asegurar que los consumidores puedan disponer de productos que sean sanos, seguros y de buena calidad, así como fomentar la salud y el bienestar animal.

El Reglamento (CE) nº 710/2009 de la Comisión, de 5 de agosto de 2009, establece los requisitos básicos de la producción animal de la acuicultura ecológica y no ecológica. En él se recoge que el bajo impacto ambiental de los piensos sea una prioridad, y en segundo lugar, que los piensos para los peces carnívoros se obtendrán teniendo en cuenta, entre otras, las materias primas recogidas en el Anexo V del Reglamento (CE) nº 834/2007 del Consejo, de 28 de junio de 2007, sobre producción y etiquetado de los productos ecológicos. Entre estas materias primas cabe destacar los aceites vegetales (extracción física) de semillas y frutos oleaginosos, así como harinas de algas, especias, plantas aromáticas y polvos y extractos de plantas.

Además, también dispone que, cuando a pesar de las medidas de prevención surja un problema sanitario, podrán utilizarse tratamientos veterinarios basados en plantas y sus extractos que no tengan efectos anestésicos y sustancias tales como oligoelementos, metales, inmunoestimulantes naturales o probióticos autorizados. El Real Decreto 1470/2001, de 27 de diciembre de 2001, regula la fabricación, elaboración, control de calidad, distribución, comercialización, almacenamiento y suministro de los medicamentos de uso veterinarios y de las sustancias y materiales utilizados para su fabricación, preparación y envasado.

El Reglamento (CE) 470/2009, de 6 de mayo de 2009, regula los requisitos que debe cumplir un medicamento para que pueda ser utilizado en las granjas de peces. Entre otros, les fija un límite máximo de residuos (LMR) tras el uso de un medicamento veterinario autorizado o reconocido como admisible en un producto alimenticio.

También está en vigor la Orden PRE/2169/2013, de 18 de noviembre de 2013, por la que se modifican el anexo I del Real Decreto 1977/1999, de 23 de diciembre de 1999,

por el que se establecen los principios relativos a la organización de los controles veterinarios sobre los productos procedentes de países terceros, y el anexo II del Real Decreto 1976/2004, de 1 de octubre de 2004, por el que se establecen las normas zoosanitarias aplicables a la producción, transformación, distribución e introducción de los productos de origen animal destinados al consumo humano.

En cuanto al control de las enfermedades relacionadas con la actividad de la acuicultura marina está en vigor la Directiva 2006/88/CE del Consejo, de 24 de octubre de 2006, relativa a los requisitos zoosanitarios de los animales y de los productos de la acuicultura, y a la prevención y el control de determinadas enfermedades de los animales acuáticos.

1.3. Enfermedades infecciosas en los peces de acuicultura

La producción acuícola es vulnerable a los efectos adversos de las condiciones ambientales y las enfermedades. La masificación de los peces en esteros y jaulas promueve la propagación de enfermedades infecciosas, tanto a través del agua, por rozamiento entre los peces o por canibalismo de peces enfermos o muertos, y además la naturaleza ubicua de la mayoría de los patógenos hace que sea prácticamente imposible el aislamiento de los peces frente a las infecciones (Arijo, 2005).

En términos de producción, las enfermedades infecciosas causan pérdidas económicas en la acuicultura debido a la mortalidad de los animales, los costes de los tratamientos y el descenso de la producción. Así, los brotes de enfermedades habrían causado pérdidas de decenas de miles de millones de dólares en los últimos 20 años al sector acuícola (FAO, 2016). Entre organismos causantes de enfermedades en los peces nos podemos encontrar tanto bacterias como virus, hongos y protozoos.

1.3.1. Causadas por hongos

Los problemas en peces causados por hongos, se deben fundamentalmente a la mala calidad del agua, así como a otros factores bióticos como son parásitos que causan lesiones externas donde bacterias y hongos oportunistas se establecen, agravando así la enfermedad. Son pocos los géneros y especies que se conocen como causantes de

enfermedades de peces, y entre ellas están la Ictiofonosis (causada por *Ichthyophonus hoferi*), Saprolegniasis (causada por *Saprolegnia parasitica*) y Branchiomycosis (causada por *Branchiomyces sanguinis*), que afectan a branquias, piel, aletas y pueden llegar a causar la muerte (Rodríguez *et al.*, 2001).

1.3.2. Causadas por virus

La presencia de estas enfermedades se debe sobre todo a la importación de huevos, crías o reproductores de países en donde está presente la enfermedad. Entre ellas cabe destacar: Necrosis Hematopoyética Epizootica (causada por *Iridovirus*), Septicemia Vírica Hemorrágica y Viremia de Primavera de la Carpa (ambas causadas por *Rhabdovirus*), y la Enfermedad Viral del Bagre de Canal (causada por un herpesvirus) (Rodríguez *et al.*, 2001).

1.3.3. Causadas por parásitos

Los parásitos son organismos que viven sobre o dentro de otro organismo vivo, del que obtiene parte o todos sus nutrientes. Las enfermedades parasitarias sólo se manifiestan cuando las condiciones del medio ambiente –principalmente las altas densidades mantenidas en las condiciones de cautividad- permiten la proliferación del parásito (Rodríguez *et al.*, 2001). Entre los parásitos podemos encontramos protozoos (*Trichodina*, *Ichthyophthirius*, *Myxobolus*, etc.), o animales multicelulares como los helmintos (tremátodos, céstodos, nemátodos, acantocéfalos, etc.), anélidos y crustáceos (Rodríguez *et al.*, 2001).

1.3.4. Causadas por bacterias

Existe una gran variedad de especies bacterianas causantes de enfermedades en los peces, entre las que podemos destacar: la Enfermedad bacteriana del riñón (causada por *Renibacterium salmoninarum*); la Furunculosis (causada por *Aeromonas salmonicida*); la Septicemia causada tanto por bacterias del género *Aeromonas* (se denominan Aeromoniasis) o del género *Pseudomonas* (llamada Pseudomonas); el Botulismo de los peces (provocado por *Clostridium*); la Estreptococosis o Septicemia estreptocócica (generada por *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus agalactiae*); la Columnarias (la provoca *Flavobacterium columnare* y *Flexibacter columnaris*); la Vibriosis (causada por bacterias del género *Vibrio*); la Pseudotuberculosis o

Pasteurelosis (originada por *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*) y la Tenacibaculosis (enfermedad provocada por *Tenacibaculum maritimum*) (Rodríguez *et al.*, 2001; Balbuena y Rios, 2011).

En el sur de la península ibérica, unas de las más frecuentes en peces cultivados son la Vibriosis y la Pseudotuberculosis. (Zorrilla *et al.*, 2003; y Arijo *et al.*, 2005).

La Vibriosis es una enfermedad causada por una infección por bacterias del género *Vibrio*, más comúnmente por *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio fischeri*, *Vibrio vulnificus* y *Vibrio harveyi*, que pueden encontrarse en la microbiota intestinal de los animales marinos, o como patógeno primario y oportunista de éstos, provocando en muchas ocasiones una alta mortalidad (Ransangan y Mustafa, 2009; Joshi *et al.*, 2014). Muchas de estas especies son patógenas para los animales en acuicultura.

En general, los signos de enfermedad causados por *Vibrio spp.* incluyen letargo, lento crecimiento, lenta metamorfosis, anemia, ascitis, malformación del cuerpo y opacidad muscular. Además, pueden mostrar decoloración de la piel, hemorragias en el hígado y riñón, presencia de lesión necrótica roja en el músculo abdominal y eritemas (manchas de sangre) en la base de las aletas y dentro de la boca, así como hemorragias petequiales en la pared muscular (Aguirre-Guzmán *et al.*, 2004). En muchos casos, las bacterias del género *Vibrio* pueden clasificarse como oportunistas, que causan enfermedad cuando los organismos hospedadores están inmunodeprimidos o estresados debido a unas condiciones intensivas de cultivo y a condiciones ambientales adversas (Alderman y Hastings, 1998).

La Pasteurelosis o también llamada Pseudotuberculosis es una enfermedad causada por la bacteria *P. damsela* subsp. *piscicida*. Es considerada una de las enfermedades bacterianas más peligrosas en la acuicultura a nivel mundial debido a su amplia gama de hospedadores, la alta tasa de mortalidad y su distribución ubicua, causando por ello grandes pérdidas económicas.

El patógeno es capaz de infectar una gran variedad de peces marinos, incluyendo la seriola (*Seriola quinqueradiata*); la dorada (*Sparus aurata*), la lubina (*Dicentrarchus labrax*), el lenguado (*Solea senegalensis* y *Solea solea*) y la cobia (*Rachycentron canadum*) (Romalde, 2002). Se han descrito diferencias en la susceptibilidad a la

enfermedad en base al estadio de los peces. Aunque los huéspedes naturales del patógeno son una amplia variedad de peces marinos, estos tienen mayor incidencia en peces pequeños de dorada y lubina (Toranzo *et al.*, 1997).

La Pasteurelosis provoca septicemia en los peces infectados, y genera colonias bacterianas que crecen en órganos como hígado, riñón o bazo. Los síntomas externos son pérdida de peso en los peces, oscurecimiento de la piel y necrosis localizada en las branquias (Blanco *et al.*, 2004).

La bacteria *Aeromonas hydrophila* es un patógeno oportunista que causa enfermedades en una gran variedad de peces cuando están bajo situaciones de estrés. Es el agente causante del MAS (*Motile Aeromonas Septicemia*). Esta enfermedad se caracteriza por la presencia de síntomas externos como pequeñas lesiones superficiales, hemorragias locales particularmente en las branquias, así como úlceras, abscesos, exoftalmia, distensión abdominal y síntomas internos tales como anemia o acumulación de líquido ascítico (Alain, 2009).

A. hydrophila también se relaciona con el síndrome ulcerante epizoótico (SUE), una enfermedad que se ha encontrado en 18 países de la región Asia-Pacífico, y en más de 100 especies de peces (Lilley *et al.*, 1992). Esta es una enfermedad que debilita progresivamente al pez caracterizada por la aparición de graves lesiones necróticas en la piel y en la musculatura.

1.4. Impactos derivados del uso de quimioterápicos

Para combatir las enfermedades microbianas se suelen utilizar distintos fármacos o quimioterápicos, tales como antibióticos, fungicidas, compuestos antiparasitarios, etc. Sin embargo estos compuestos pueden generar efectos adversos, tanto en los peces, como en el medio ambiente y en los consumidores (Buschmann, 2001).

La utilización de baños de formol para prevenir y eliminar parásitos y bacterias de la superficie externa de los peces está ampliamente extendido en la acuicultura, aunque son también contaminantes para el medio marino, y pueden alterar gravemente el ecosistema al resultar tóxico para la vida marina y la especie cultivada (Borja, 2002).

Además, desde el año 2004, la Organización Mundial de la Salud (OMS) incluyó el formol (formaldehído) en el grupo 1 de sustancias carcinógenas en humanos, basándose en una serie de pruebas que relacionan el formaldehído con el cáncer de cavidad oral, cavidad nasal, faringe, laringe y pulmón (IARC, 2006).

La mayor parte de los antibióticos y otros químicos suministrados terminan en el ambiente, a través del alimento no ingerido y en las deposiciones, permaneciendo durante varios meses en los sedimentos luego de ser suministrados y estar presentes a cientos de metros de los sistemas de cultivo (Weston, 1996), pudiendo ser posteriormente consumidos por organismos detritívoros o peces silvestres que se alimentan alrededor de los sistemas de cultivo. El uso masivo de estos ha provocado cambios cualitativos y cuantitativos en la flora microbiana, efectos tóxicos en los organismos salvajes y alteraciones en la biodiversidad (Buschmann, 2001; Borja, 2002).

Por último, entre los efectos no deseables sobre las poblaciones silvestres, hay que mencionar la aparición y transferencia de microorganismos resistentes a los antimicrobianos (Aoki, 1997; Heuer *et al.*, 2009; Allen, 2014).

1.5. Resistencia a los antimicrobianos

El uso de agentes antimicrobianos en el control de enfermedades en la acuicultura impulsa la aparición de microorganismos resistentes a los antimicrobianos y además promueve la difusión tanto de bacterias resistentes a los fármacos y como de genes de resistencia (Tabla 2). La propagación de esta resistencia no está necesariamente restringida por fronteras filogenéticas, geográficas o ecológicas, ni tampoco se limita a una especie de bacteria en particular. Por lo tanto, el uso de agentes antimicrobianos en un nicho ecológico como la acuicultura puede provocar la aparición de resistencia a los antimicrobianos en otros nichos (Heuer *et al.*, 2009). Además, los mecanismos de transferencia horizontal de ADN permiten que las bacterias adquieran resistencia a múltiples clases de antibióticos, actuando como reservorios de genes de resistencia, incluyendo las bacterias que son patógenos en humanos (Romero *et al.*, 2012).

Plásmidos que contienen determinantes multirresistentes han demostrado ser transferibles a *Escherichia coli* provenientes de *A. salmonicida*, *A. hydrophila*,

Edwardsiella tarda, *Citrobacter freundii*, *P. damsela* subsp. *piscicida*, *Vibrio anguillarum* y *Vibrio salmonicida* (Akinbowale *et al.*, 2007; Kruse *et al.*, 1994). Lo mismo se ha demostrado para un plásmido multirresistente que puede ser transferido de *Vibrio cholerae* O1 a *A. salmonicida*, *A. hydrophila*, *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. anguillarum*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.* y *E. coli* (Kruse *et al.*, 1995). Además también se ha demostrado la transferencia de genes de resistencia desde el patógeno de peces *V. anguillarum* a *V. cholerae*, bacteria causante del cólera en humanos (Nakajima *et al.*, 1983).

Tabla 2. Diferentes clases de antibióticos utilizados en la acuicultura, su importancia para la medicina humana y ejemplos de bacterias patógenas multirresistentes aisladas de instalaciones acuícolas (Modificado de Defoirdt *et al.*, 2011).

Antibiótico	Importancia para la medicina humana	Bacteria multirresistente
Estreptomicina	Crítica	<i>Edwardsiella ictulari</i>
Florfenicol	Importante	<i>Enterobacter spp</i> <i>Pseudomonas spp.</i> <i>Vibrio spp.</i>
Amoxicilina	Crítica	<i>Aeromonas spp.</i> <i>Edwardsiella tarda</i>
Ampicilina	Crítica	<i>Vibrio harveyi</i>
Enrofloxacin	Crítica	<i>Tenacibaculum maritimum</i>
Eritromicina	Crítica	<i>Salmonella spp.</i>
Furazolidon	Crítica	<i>Vibrio anguillarum</i>
Nitrofurantoína	Importante	<i>Vibrio harveyi</i> <i>Aeromonas spp.</i>
Ácido oxolínico	Crítica	<i>Pseudomonas spp.</i> <i>Vibrio spp.</i>
Sulfadiazina	Importante	<i>Aeromonas spp.</i>
Tetraciclina	Muy importante	<i>Aeromonas hydrophila</i>
Oxitetraciclina	Muy importante	<i>Aeromonas salmonicida</i>

Navarrete *et al.* (2008) evaluaron los efectos del tratamiento con oxitetraciclina (OTC) en las poblaciones bacterianas presentes en los intestinos de ejemplares de salmón del Atlántico. La microbiota de los intestinos de salmones tratados con OTC era menos diversa y sólo se componía de *Aeromonas*, en concreto *Aeromonas sobria* y *A. salmonicida*, ambas consideradas patógenos comunes de peces porque pueden causar Forunculosis y Septicemia hemorrágica. Por tanto, la reducción en la diversidad de la

microbiota intestinal observada después del tratamiento con OTC facilitaría la proliferación o la invasión de microorganismos oportunistas.

En un estudio realizado por Le *et al.* (2005) se encontró una elevada resistencia a la norfloxacin, al ácido oxolínico, a la trimetoprima y al sulfametoxazol entre bacterias en muestras de lodo de los lugares de cultivo de gambas en Vietnam, y especies del género *Bacillus* y *Vibrio* fueron predominantes entre las bacterias que eran resistentes a los antimicrobianos.

La propagación de bacterias resistentes también puede transmitirse directamente y causar infecciones en los seres humanos por contacto directo con el agua o con organismos acuáticos, o a través de la manipulación o el consumo de productos acuícolas. La difusión directa de los ambientes acuáticos a los seres humanos puede implicar patógenos humanos, tales como *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, así como patógenos oportunistas tales como *E. tarda*, *Streptococcus iniae* y *E. coli* (Blake *et al.*, 1979; Sandaa *et al.*, 1992; Weinstein *et al.*, 1997; Bisharat *et al.*, 1999).

1.6. Alternativas de bajo impacto ambiental para el tratamiento de enfermedades infecciosas

Actualmente, los antibióticos sólo son parcialmente eficaces debido a la aparición de bacterias resistentes. Esto, junto con las restricciones en la utilización de antibióticos, ha impulsado la búsqueda de soluciones alternativas y de menor impacto ambiental (Dabrowsky *et al.*, 2004; Stenholm *et al.*, 2008). La efectividad de éstas dependerá del tipo de producto utilizado, del método y la dosis suministrada, de la especie hospedadora y la fase de cultivo en la que se encuentra el animal.

1.6.1. Inmunoestimulantes

Los inmunoestimulantes son sustancias que actúan sobre el sistema inmune, activando o aumentando la actividad de cualquiera de sus componentes, y permiten a los animales poseer mayor resistencia frente a infecciones virales, bacterianas, hongos y parásitos (Robertsen, 1999). Algunas de las sustancias más empleadas como

estimulantes del sistema inmunológico son algunos extractos de algas y hongos, las vitaminas C y E, y las endotoxinas bacterianas.

1.6.2. Bacteriófagos

Esta técnica alternativa consiste en el control de bacterias patógenas mediante el uso de virus bacteriófagos. Una ventaja importante del uso de bacteriófagos es que no afectará a las bacterias beneficiosas debido a su especificidad. Además, el desarrollo de la resistencia será menor, ya que debido a que los fagos tienen una mayor tasa de mutación y replicación, pueden sobrepasar la adaptación de las bacterias. Por el contrario, una limitación para el uso de fagos como control de bacterias es que puedan transferir factores de virulencia (Austin *et al.*, 2003).

1.6.3. Probióticos

Los probióticos son microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, ejercen un efecto beneficioso sobre el huésped. Este efecto beneficioso proviene de varias causas como son la mejora de la calidad del agua, la reducción de materia orgánica sedimentada, el aumento de la respuesta inmune o la capacidad de aportar beneficios nutricionales debido a su efecto sobre el sistema digestivo (Askarian *et al.*, 2011).

En general, para que una cepa sea considerada como cepa probiótica debe cumplir una serie de características: ser habitantes normales del tracto gastrointestinal así como tener efecto antagonista frente a diferentes patógenos; no ser patógeno; resistencia al pH y a la bilis, tener un tiempo corto de reproducción, ser capaces de adherirse a las células intestinales y mostrar potencial de colonización en el tracto gastrointestinal (Kailasaphaty y Chin, 2000). La mayoría de las bacterias probióticas propuestas para el uso en acuicultura pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Saccharomyces* y *Pseudomonas* (Balcázar y Rojas-Luna, 2007; Fjellheim *et al.*, 2007; Abd El-Rhman *et al.*, 2009; Chiu *et al.*, 2010; Dotta, 2011).

1.6.4. Vacunas

La vacunación es un método preventivo tradicional que se utiliza en la acuicultura para el control de enfermedades infecciosas. Las vacunas son un preparado de antígenos

que provoca una respuesta específica, induciendo una producción de anticuerpos que generan una respuesta de defensa ante microorganismos patógenos (Erdal y Reitan, 1992). La efectividad de las vacunas varía considerablemente dependiendo de la especie hospedadora, la fase de cultivo y las condiciones de temperatura (Sommerset *et al.*, 2005).

1.6.5. Terapias de inhibición del crecimiento, de la replicación y de la expresión de genes de virulencia

Una técnica alternativa en el control de bacterias patógenas consiste en la inhibición de su crecimiento. En este sentido, el uso de ácidos grasos de cadena corta y de polihidroxicanoatos, como el poli- β -hidroxibutirato (PHB) en las dietas de animales resulta efectivo para el control de patógenos como *Salmonella sp.* y *Vibrio sp.* (Defoirdt *et al.*, 2011).

Una terapia específicamente para *Vibrios* se aprovecha de la compartición de su genoma en dos cromosomas para inhibir su replicación. El rCTB, iniciador de la replicación del segundo cromosoma, es codificado por todos los *Vibrios* y no se encuentra fuera de la familia *Vibrionaceae*, con lo cual la inhibición del gen rCTB es una buena medida específica de control biológico sobre *Vibrios* (Defoirdt *et al.*, 2011).

Otra alternativa consiste en inhibir específicamente las funciones necesarias para infectar al huésped, que se denominan factores de virulencia. Esta terapia puede actuar de dos modos: interfiriendo con la regulación de la expresión del factor de virulencia (afectando con frecuencia a varios factores de virulencia a la vez) o inhibiendo específicamente un factor de virulencia en concreto (Defoirdt *et al.*, 2011).

El *quorum sensing* es un mecanismo de comunicación celular por el cual muchas bacterias coordinan la expresión de ciertos genes gracias a la presencia de moléculas señal (denominadas autoinductores), que se acumulan en el exterior de la bacteria a medida que la densidad celular bacteriana aumenta. Este mecanismo permite a la bacteria modificar colectivamente su comportamiento en respuesta a cambios en la densidad celular y composición de especies de la comunidad microbiana que la rodea (Waters y Bassler, 2005).

Los procesos que son controlados por el *quorum sensing*, entre ellos la bioluminiscencia, la secreción y expresión de genes de virulencia o la formación de biofilms, son muy costosos e improductivos cuando son realizados por una sola célula, pero son muy efectivos cuando se realiza por toda la población celular bacteriana (Papenfort y Bassler, 2016).

Es por ello que los mecanismos que interfieren esta comunicación celular, llamados generalmente *quorum quenching*, están siendo utilizados como nuevas terapias antimicrobianas. El objetivo en este caso sería evitar la expresión de esos genes de virulencia bloqueando mediante algún compuesto la detección de las moléculas señal o inhibiendo la detección de las moléculas señal.

1.6.6. Sustancias naturales

Aunque el empleo de ciertos tipos de plantas en la acuicultura es reciente, su utilización como recurso terapéutico natural se remonta siglos atrás. La destilación como método de producción de aceites esenciales fue concebida y usada por primera vez en Oriente hace más de 2000 años, y fue mejorada en el siglo IX por los árabes. Durante el siglo XIII, los aceites esenciales empiezan a elaborarse en farmacias y sus efectos farmacológicos se describían en *Pharmacopoeias*, pero su uso no se extendió en Europa hasta el siglo XVI, cuando se describió la destilación y el uso de aceites esenciales de romero, clavo, anís, nuez moscada y canela. Sin embargo, en el curso de los siglos XIX y XX el uso de los aceites esenciales en la medicina pasó a ser secundario (Burt, 2004).

Existen pruebas que concluyen que la aplicación de productos provenientes de plantas en los peces contribuyen al fortalecimiento del sistema inmunológico, además de mostrar efectos antiestresantes, antitoxigénicos, antiparasitarios y antimicrobianos. Esto es debido a componentes como alcaloides, flavonoides, pigmentos, fenoles, terpenoides, esteroides y aceites esenciales (Citarasu *et al.*, 2002; Sivaram *et al.*, 2004).

El hecho de que sean sustancias económicas, además de la ventaja ambiental que suponen por su biodegradación los convierten en una opción muy considerable de usar en la acuicultura.

1.7. Extractos de plantas como antimicrobianos

Los extractos de plantas son una fuente potencialmente útil de compuestos antimicrobianos que pueden inhibir el crecimiento de determinadas bacterias y patógenos o bloquear la transcripción de los virus.

Estos extractos pueden contener una mezcla variable de más de sesenta componentes individuales, principalmente de terpenoides, así como de ácidos, alcoholes, aldehídos y componentes organosulfurados (Burt, 2004). Los componentes principales pueden constituir más del 85 % del extracto, mientras que el resto de compuestos solo están presentes como trazas. Pueden ser sintetizados por los órganos de la planta (flores, hojas, tallos, ramas, semillas, frutos, raíces) y se almacenan en células secretoras, cavidades, canales, las células epidérmicas o tricomas glandulares (Bakkali *et al.*, 2008).

Debido al gran número de grupos de componentes químicos diferentes presentes en los extractos, es probable que su actividad antibacteriana no se atribuya a un solo mecanismo específico, sino a varios objetivos en la célula bacteriana (Carson *et al.*, 2002). Estos pueden ser: degradación de la pared celular, daños en la membrana citoplasmática, daños a las proteínas de la membrana, salida del contenido celular o coagulación del citoplasma (Burt, 2004).

Los resultados de diferentes estudios son difíciles de comparar, principalmente debido a los diferentes métodos de prueba, cepas bacterianas y fuentes de muestras antimicrobianas utilizadas. Además, la composición de los extractos de plantas puede variar considerablemente según la región geográfica, las propiedades del suelo, la temperatura a la que ha sido cultivada, la variedad y el método de extracción. Un ejemplo de esto es el estudio de Runyoro *et al.* (2010), donde se estudiaba la composición química y la actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de cuatro especies del género *Ocimum*. Dos de las especies estudiadas variaban su composición química de manera clara. Los componentes principales de la primera especie (*O. basilicum* A) fueron el 1-8 cineol (54,3 %), el β -pineno (8,15 %) y el α -terpineol (6,6 %). Los componentes principales de la segunda especie (*O. basilicum* B) fueron el E-myrróxido (19,6 %), el óxido cariofileno (11,4 %) y el α -copaeno (7,5 %). Además, el principal componente de la especie B no estaba presente en la especie A, mientras que

el β -pineno y el α -terpineol, ambos presentes en gran cantidad en la especie A no estaban presentes en la especie B.

Esto mismo se ha encontrado también entre especies de otros géneros. El estudio de Aligiannis *et al.* (2001) sobre la composición y actividad antimicrobiana de los aceites esenciales de dos especies de orégano (*Origanum scabrum* y *O. mycrophyllum*) revelaron también una gran diferencia entre ambas especies. Los principales componentes de *O. scabrum* fueron el carvacrol (74,86 %), el p-cimeno (5,41 %) y el timol (4,51 %), mientras que en *O. mycrophyllum* fueron el terpen-4-ol (24,86 %), el γ -terpineno (13,83 %) y el linalol (10,81 %).

Esta diferencia en la composición química de las sustancias naturales puede afectar a la capacidad antimicrobiana de las mismas. Para la valoración de la capacidad antimicrobiana se puede utilizar el concepto de concentración mínima inhibitoria (CMI). La CMI se define como la menor concentración de antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento de una cepa bacteriana dada en medio de cultivo. Siguiendo con ambos ejemplos, en el estudio de Runyoro *et al.* (2010) las especies A y B de *O. basilicum* presentaron diferente inhibición cuando fueron enfrentadas a distintas bacterias, siendo en todos los casos la especie A más susceptible de inhibir el crecimiento bacteriano que la especie B, mientras que en el estudio de Aligiannis *et al.* (2001) la especie *O. scabrum* inhibió el crecimiento a una concentración mínima inhibitoria mucho menor que *O. mycrophyllum*.

1.7.1. Toxicidad

Un aspecto fundamental para proponer una sustancia natural como agente antimicrobiano es conocer si posee compuestos activos que tengan efectos tóxicos sobre los peces o sobre el medio. Fernández-Calienes *et al.* (2009) evaluaron la mortalidad causada por extractos etanólicos de diversas plantas sobre larvas de *Artemia salina*. Del total de extractos evaluados, cinco de ellos resultaron extremadamente tóxicos o muy tóxicos, exhibiendo unos valores de concentración letal 50 (CL50) menores de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

El efecto tóxico es importante en el caso de *Callistemon citrinus*. Ali *et al.* (2011) investigaron su actividad como relajante (antiespasmódico). Descubrieron la presencia

de constituyentes relajantes, además de cloroformo y n-butanol, y sugirieron la presencia de componentes antagonistas de calcio en las fracciones de metanol. A pesar de ser una de las sustancias con menor CMI (0,0025 y 0,21 mg mL⁻¹ para *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* respectivamente), la utilización de esta planta puede introducir agentes citotóxicos en el medio (Mabhiza *et al.*, 2016).

1.7.2. Administración

1.7.2.1. Formas de administración

Las sustancias naturales se han utilizado en distintas formas, tanto en crudo (hojas, raíces) como su extracto o componente activo. La utilización de la planta sin procesar tiene la ventaja del poco esfuerzo para obtenerlo y aplicarlo, especialmente en los piensos.

El ajo (*Allium sativum*) tiene un compuesto en el bulbo llamado aliina, que produce una reacción química cuando es machacado, rebanado o masticado. Cuando las membranas celulares que dividen las diversas capas que conforman el ajo se rompen, se libera una enzima llamada alinasa, que metaboliza la aliina convirtiéndola en alicina (Figura 1) (Ankri y Mirelman, 1999). Ésta es uno de los principios activos del ajo, y se convierte con facilidad en otros químicos ricos en azufre capaces de circular por la sangre y que son los responsables de la actividad antimicrobiana del ajo.

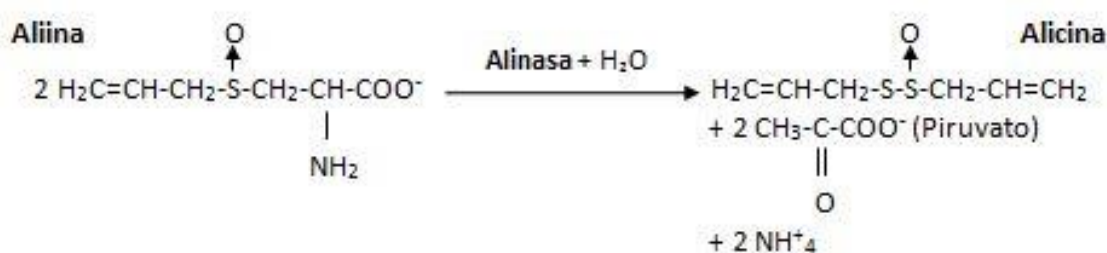


Figura 1. Generación de alicina en el ajo (Modificado de Ankri y Mirelman, 1999).

La cantidad de alicina presente en las distintas cepas de ajo varía considerablemente entre 2,8 y 7,7 mg g⁻¹ (Koch y Lawson, 1996). Talpur y Ikhwanuddin (2012) incorporaron el ajo en distintas concentraciones (5, 10, 15 y 20 g kg⁻¹) en los piensos de lubina (*Lates calcarifer*) durante dos semanas. El resultado mostró un incremento en la supervivencia de todos los grupos de peces después de ser enfrentados a *V. harveyi*,

siendo superior en los peces a los que se les administró una concentración de 10 g kg⁻¹ (83,35 % de supervivencia) frente al 33,3 % del grupo control. Además se demostró un incremento significativo en el crecimiento, en el peso, en la tasa de conversión del alimento, y en varios parámetros hematológicos, bioquímicos e inmunológicos en todos los grupos de peces alimentados con ajo.

Estos resultados están en línea los de Nya *et al.* (2009). Durante 14 días incorporaron el ajo a distintas concentraciones (0 %, 0,05 %, 0,1 %, 0,5 % y 1 %) al alimento de especies de trucha arcoíris (*Oncorhynchus mykiss*). Después del tratamiento se inoculó en los peces *A. hydrophila*, concluyendo que las tasas más bajas de mortalidad correspondían a los peces alimentados a concentraciones de 0,5 % y 1 %, siendo ambas del 4 % frente al 88 % de los peces control.

El aceite del árbol del té es el aceite esencial derivado de la planta *Melaleuca alternifolia*. Se compone de hidrocarburos (terpenos, monoterpenos, sesquiterpenos) y sus alcoholes asociados, a los que se les atribuye su actividad antimicrobiana. La actividad del aceite del árbol del té tiene amplio espectro, ya que incluye efecto antibacteriano, antifúngico, antiviral y antiprotazoario. Mientras que la mayoría de las bacterias son susceptibles al aceite del árbol del té a concentraciones de 1 % o menos (Carson *et al.*, 2002), otras como *Enterococcus faecalis* y *P. aeruginosa* tienen CMI mayores a 2 %.

Lo mismo ocurre en el caso del jengibre (*Zingiber officinale*). Karuppiah y Rajaram (2012) evaluaron las propiedades antibacterianas del jengibre contra patógenos clínicos resistentes a múltiples fármacos. Los resultados que obtuvieron fueron que los extractos de rizomas de jengibre que se ensayaron frente a cinco bacterias Gram negativas y dos Gram positivas desarrollaban inhibición a todas las bacterias excepto ante *Enterobacter sp.* y *Klebsiella sp.* Esto se debe principalmente al gingerol, su componente principal.

Otra planta utilizada para el tratamiento de diferentes afecciones es el Aloe vera (*Aloe vera L.*). En un estudio publicado por Reyes y Fernández (2014) se mostró la actividad bacteriostática y bactericida del extracto etanólico foliar del Aloe vera en las bacterias *S. aureus*, *E. coli* y *P. aeruginosa*, así como el efecto fungistático y fungicida en el

complejo *Candida albicans*. Asimismo, concluyó que a mayor tiempo de exposición al extracto (48 h) se obtuvo una actividad superior, ya que el crecimiento de todas las cepas de microorganismos estudiadas fue erradicado a bajas concentraciones del mismo.

Núñez *et al.* (2001) determinaron la concentración mínima inhibitoria (CMI) de extractos de eucalipto (*Eucalyptus sp.*) frente a tres especies bacterianas del género *Aeromonas*, patógenas de peces. Los resultados demostraron que *A. salmonicida* atípica tuvo la mayor sensibilidad al actuar con el extracto de *Eucalyptus sp.* con un valor de CMI de 0,25 mg mL⁻¹. Además, mostró un 100 % de efectividad sobre todas las cepas bacterianas. La presencia de taninos, eucaliptol, terpenos y otros son los responsables de esta actividad.

En su estudio, Gill y Holley (2004) comentaron el efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano de la canela frente a *Listeria monocytogenes* y *Lactobacillus sakei*. Esta inhibición se produce por uno de sus componentes principales, el cinamaldehído. El estudio concluye que solamente se inhibe el crecimiento de *L. monocytogenes* y no de *L. sakei*. Esto puede deberse a que la susceptibilidad a la actividad del cinamaldehído en *L. sakei* es menor a la que se encuentra en *L. monocytogenes* o que posee mecanismos de resistencia que le permitan inactivar el efecto del cinamaldehído. Además, este compuesto posee actividad inhibitoria contra varias especies de hongos y bacterias, incluyendo muchas de relevancia como *Campylobacter jejuni*, *Salmonella sp.*, *E. coli* O157:H7 y *L. monocytogenes* (Friedman *et al.* 2002).

El aceite de clavo (*Syzygium aromaticum*) también posee propiedades antimicrobianas, antibacterianas y antifúngicas. Esto es principalmente debido al eugenol, su componente principal. En el estudio de Gupta *et al.* (2009) se mostró que el extracto etanólico (50 %) del aceite de clavo fue efectivo contra *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus sp.*, *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *L. monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *E. coli* y *Klebsiella sp.*, y fue resistente a *P. aeruginosa*. La CMI varió entre los 12,5 mg mL⁻¹ de *S. aureus* y los 200 mg mL⁻¹ de *B. subtilis* y *M. luteus*.

1.7.2.2. Rutas de administración

Son tres los métodos que se han utilizado las sustancias naturales en la acuicultura: la inyección, la inmersión (baño) y la administración oral. Cada método tiene sus ventajas y desventajas.

La inyección es el método más rápido y efectivo de administración especialmente para peces grandes (>10-15 g). Aunque es muy efectivo, en una producción intensiva puede ser muy costosa, provocar estrés a los peces y no es práctica para peces pequeños menores de 10 g (Sakai, 1999).

La inmersión es otro método que ha resultado efectivo y más práctico para peces de pequeño tamaño (<5 g) aunque requiere la preparación de una gran cantidad de la solución a ensayar, lo que puede ser costoso. Por otra parte, el tiempo de exposición y el número de repeticiones (baños) son factores variables todavía desconocidos (Galindo-Villegas y Hosokawa, 2004).

La administración oral es el método más práctico y utilizado en la acuicultura. Es un método que no genera estrés a los peces y es válido para cualquier tamaño de pez (Awad y Awaad, 2017).

1.7.2.3. Dosis

No existe necesariamente una correlación positiva entre la dosis y los efectos antimicrobianos de las sustancias naturales. Una dosis específica puede inducir un efecto inmunoestimulador mientras que otra puede no inducir ninguna respuesta (Awad y Awaad, 2017). Divyagnaneswari *et al.* (2007) inyectaron un extracto de la planta *Solanum trilobatum* a distintas concentraciones (4, 40 y 400 mg kg⁻¹ de peso corporal) en ejemplares de tilapia (*Oreochromis mossambicus*) y observaron un aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno solo con la concentración de 40 mg kg⁻¹. Aunque en otra investigación el uso de dosis de 0,025 %, 0,05 %, 0,1 % y 0,2 % de extracto de *Sophora flavescens* en tilapia del Nilo provocó una mejora de la respuesta inmunitaria, el máximo se registró a la dosis de 0,1 %, la misma a la que se alcanzó el máximo de supervivencia después de enfrentarla con *S. agalactiae* (Wu *et al.*, 2013).

1.8. Hipótesis y objetivos

La sobredosis de antibióticos y otros agentes antimicrobianos en la acuicultura han demostrado tener impactos negativos en el medio ambiente y generar resistencia a los antibióticos en bacterias patógenas, lo que constituye un riesgo importante para la salud. Considerando los impactos producidos, y para minimizar los efectos de la sobreutilización de los antibióticos, es de gran importancia comprender cómo las sustancias naturales pueden actuar como método alternativo y profiláctico en el control de enfermedades bacterianas en la acuicultura. Por tanto, como hipótesis de partida en el presente trabajo se espera que las sustancias naturales inhiban el crecimiento de diversas bacterias patógenas para los peces.

En este contexto, el objetivo de este trabajo fue la determinación de la potencialidad de distintos extractos de plantas, algas y cianobacterias para su uso como antimicrobianos frente a diversas bacterias patógenas en instalaciones acuícolas.

Para conseguir el Objetivo General del trabajo se plantearon los siguientes Objetivos Parciales que constituirán las diferentes pruebas a realizar:

1. Observar si existe capacidad inhibitoria de los diferentes extractos “*in vitro*” ante *Vibrio harveyi*, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *Aeromonas hydrophila*, y *Vibrio fischeri*.
2. Detección de la toxicidad potencial de las sustancias ensayadas mediante la observación de inhibición de la bioluminiscencia de *V. fischeri*.
3. Detección de inhibición de *quorum sensing* (actividad *quorum quenching*) de las sustancias ensayadas.
4. Observar la estabilidad de las sustancias a distintas temperaturas y tiempos de almacenaje.
5. Estabilidad de las sustancias con capacidad inhibitoria al ser adicionadas al alimento de los peces.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Extractos utilizados y bacterias de ensayo

2.1.1. Extractos utilizados

Para las pruebas se utilizaron distintos extractos obtenidos de las siguientes especies:

Plantas:

- Extracto procedente del bulbo fresco de ajo (*Allium sativum*).
- Extractos procedentes de la hoja fresca de las siguientes plantas: calistemo (*Callistemon citrinus*, Curtis), lavanda (*Lavandula angustifolia*), romero (*Rosmarinus officinalis* L.), orégano francés (*Plectranthus amboinicus* (Lour) spreng.), tomillo blanco (*Thymus mastichina* L.), salvia rosa (*Salvia grahamii* Benth), laurel (*Laurus nobilis*) y mirto (*Myrtus communis*).
- Aceites purificados: Aceite de clavo (*Syzygium aromaticum*), aceite del árbol del té (*Melaleuca alternifolia*), aceite de citronella (*Cymbopogon citratus*) y aceite de aloysia (*Aloysia citriodora*).

Algas y cianobacterias:

- *Hydropuntia cornea* y *Laminaria japonica*: ambas algas fueron facilitadas por el Departamento de Ecología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga.
- *Ulva sp.*: facilitada por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga.
- *Spirulina platensis*: facilitada por el Departamento de Ecología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga.

2.1.2. Bacterias de ensayo

Para el trabajo se emplearon cultivos puros de las bacterias patógenas gram negativas *Vibrio harveyi* Lg10/6, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* LgH41/01 y *Aeromonas hydrophila* Lg28/4, aisladas de lenguado (*Solea senegalensis*), y *Vibrio fischeri* aislada de agua de mar. Las bacterias se cultivaron en caldo y agar de soja tripticasa al 2 % de NaCl (TSB y TSA respectivamente) a 22 °C durante 24 h.

2.2. Preparación de los extractos de plantas, aceites, algas y cianobacterias.

2.2.1. Preparación de los extractos de plantas y aceites

Para determinar la concentración que se utilizaron en las sucesivas pruebas, se realizaron ensayos previos con hojas de romero, laurel y calistemo para encontrar la máxima concentración de sustancia con la que se obtenía un preparado líquido.

En los casos de las hojas de romero, laurel y calistemo, se trituró en un mortero 1 g de hojas enteras (previamente lavadas y secadas) y se añadieron 5 mL de solución salina al 1 %, obteniendo una concentración de $0,2 \text{ g mL}^{-1}$. Para la extracción de sustancias hidrofóbicas, con las mismas plantas se realizó el mismo procedimiento, pero usando etanol al 96 % en vez de solución salina, obteniéndose también una concentración normal de $0,2 \text{ g mL}^{-1}$.

Por último, se hizo pasar los extractos resultantes por una malla de nylon de $100 \mu\text{m}$ de diámetro de poro. Todos los ensayos se realizaron por duplicado, usando solución salina y etanol.

En el caso de los preparados con aceite de clavo, de citronella, de aloysia y de árbol del té las concentraciones normales de estos fue de $500 \mu\text{L mL}^{-1}$.

2.2.2. Preparación de los extractos de algas y de la cianobacteria

Para facilitar la extracción en el mortero, las algas y la cianobacteria se guardaron en el congelador a $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24 h. Posteriormente se añadieron al mortero para su extracción manual pesos y volúmenes crecientes (tanto de solución salina como de etanol) hasta obtener una concentración normal de $0,2 \text{ g mL}^{-1}$. Seguidamente, el extracto se agitó a $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 3 h. Finalmente el extracto se centrifugó a $7500 \times g$ durante 10 min. El sobrenadante del extracto fue lo que se utilizó en el ensayo.

2.3. Capacidad inhibitoria del crecimiento bacteriano de los extractos

El ensayo de inhibición se realizó mediante el método de difusión en agar (TSAs) por la prueba de pocillos para las sustancias hidrofílicas (ensayos con solución salina) y con discos de papel en el caso de las sustancias hidrofóbicas (ensayos con etanol). Estos ensayos se realizaron mediante los siguientes pasos: de cada preparado normal

realizado se hicieron diluciones en serie 1:2 (100 mg mL⁻¹), 1:4 (50 mg mL⁻¹), 1:8 (25 mg mL⁻¹), 1:16 (12,5 mg mL⁻¹), 1:32 (6,25 mg mL⁻¹) y 1:64 (3,125 mg mL⁻¹).

En el caso del aceite de clavo, de la citronella, de la aloysia y del árbol del té, la dilución 1:2 tuvo una concentración de 250 µL mL⁻¹; la dilución 1:4 tuvo una concentración de 125 µL mL⁻¹, y así sucesivamente hasta la dilución 1:64 (7,81 µL mL⁻¹). Seguidamente se resuspendió masa bacteriana de las placas de cultivo en solución salina estéril (al 2 % de NaCl). Posteriormente se agitó y observó la turbidez de la suspensión de bacterias en la solución salina, hasta alcanzar una turbidez similar al 0,5 de la escala de McFarland (aproximadamente 10⁸ UFC·mL⁻¹). Con un hisopo estéril se sembró la superficie de una placa de TSAs, pasándola uniformemente por toda la superficie para obtener un césped bacteriano.

En el caso de las sustancias diluidas en solución salina, una vez sembradas las placas, se realizaron una serie de orificios en la superficie del agar utilizando la boca de una pipeta Pasteur esterilizada. Los pocillos debían estar lo bastante separados entre ellos para que no se superpusiesen sus zonas de inhibición. En cada pocillo se depositó 75-100 µL de cada extracto (de la normal hasta la 1:64) hasta enrasar el pocillo. Como control negativo se utilizó solución salina estéril. En el caso de los aceites se debió agitar bien la solución para que no hubiera dos fases.

En el caso de los ensayos con etanol el método empleado fue el de discos de papel de antibiograma impregnados con 10 µL de cada dilución (de la normal hasta la 1:64, y un control únicamente con etanol). Tras esperar a la evaporación del etanol, se depositaron sobre las placas sembradas con el hisopo. Todas las placas fueron incubadas a 22 °C durante 24 h en el caso de *V. harveyi*, *V. fischeri* y *A. hydrophila* y durante 48 h para *P. damsela* subsp. *piscicida*.

Transcurrido el tiempo de incubación se analizó la presencia/ausencia de halo de inhibición alrededor de cada pocillo o disco. Se tomó como concentración mínima inhibitoria a la concentración más baja de las ensayadas que generó inhibición del crecimiento bacteriano.

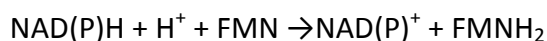
2.4. Detección de toxicidad de las sustancias ensayadas mediante la observación de inhibición de la bioluminiscencia de *V. fischeri*

Mediante este ensayo se pudo determinar la actividad tóxica aguda de una sustancia sobre la bioluminiscencia de *V. fischeri*.

Vibrio fischeri es una bacteria marina que es capaz de generar bioluminiscencia. Para que ésta se produzca, la bacteria tiene que realizar un metabolismo oxidativo y tiene que usar energía. La mayoría de las reacciones de emisión de luz en bacterias involucran la oxidación de riboflavin fosfato reducido (FMNH₂), generando flavin mononucleótido (FMN) junto con emisión de una luz verde-azulada (Lin *et al.*, 1993). Dicha reacción es:



Esta reacción está catalizada por la enzima luciferasa bacteriana. En una bacteria luminosa, el FMNH₂ es uno de los componentes esenciales en la reacción de luminiscencia y se forma mediante la siguiente reacción, la cual está catalizada por la enzima flavin reductasa:



Así se obtiene de nuevo FMNH₂, el cual se oxida rápidamente por el oxígeno molecular, dando como resultado peróxido de hidrógeno y FMN (Inouye, 1994).

La reacción de luminiscencia en este caso depende del funcionamiento del sistema de transporte de electrones en la respiración celular, por lo que una disminución en la luminiscencia de la bacteria, es indicativa de una disminución de la respiración celular. Este proceso está mediado por mecanismos de *quorum sensing* y es muy sensible a las condiciones ambientales. Por eso, cualquier sustancia que interfiera en la cadena transportadora de electrones afectará a la respiración celular, y por lo tanto a la emisión de luminiscencia de la bacteria, disminuyendo su intensidad, lo que hace que esta bacteria sea un buen bioindicador para detectar sustancias potencialmente tóxicas.

Este procedimiento se realizó con el ajo, y con los aceites de clavo, de citronella, de aloysia y del árbol del té.

En primer lugar, para ajustar la concentración de *V. fischeri* necesaria para la prueba, se suspendió masa bacteriana de la bacteria (crecida en TSAs durante 24 h) en 3 mL de solución salina, hasta conseguir una D.O. de 0,5 a 600 nm. Esta suspensión bacteriana inicial se introdujo mantuvo en aparato Microtox® M500 (Microbics Corporation, Carlsbad, CA, EE.UU.). Luego se añadieron distintos volúmenes de la suspensión inicial de la bacteria a una serie de tubos con 1 mL de solución salina, y se midió la luminiscencia en el Microtox®. Se eligió para el ensayo el inóculo de suspensión bacteriana que diera un valor en el lector de luminiscencia entre 100 y 150 unidades.

Seguidamente, se hizo una batería de tubos con 1 mL de diluciones de las sustancias a ensayar, utilizando para ello solución salina al 2 % de NaCl. Los tubos con las diluciones se introdujeron en los orificios de muestras del lector Microtox® para que adquirieran la temperatura óptima de medida (15 °C).

A todas las diluciones realizadas con los extractos, incluido un control con solución salina, se añadió la misma cantidad de suspensión de *V. fischeri* calculada anteriormente (la comprendida entre 100 y 150 unidades de lectura). Acto seguido se dejaron cultivar tanto las diluciones como el blanco durante 15 min. Pasados los 15 minutos de incubación se introdujo el blanco y cada una de las diluciones dentro del lector de luminiscencia y se anotaron los valores obtenidos.

Una vez medidos estos valores, se consideró el valor obtenido en el control como la máxima luminiscencia emitida por las bacterias en ausencia de la sustancia (100 % de bioluminiscencia). Los valores obtenidos en las diluciones se consideraron como la bioluminiscencia que emitió la bacteria en presencia de las sustancias.

A partir de estos valores, se calculó el porcentaje de disminución o extinción de la bioluminiscencia que se produce en la bacteria por la acción de la sustancia con respecto al control: $100 \times \text{valor de la muestra} / \text{valor del control}$. Para calcular este porcentaje de extinción de luminiscencia se utilizó la media obtenida de las tres réplicas realizadas en cada una de las sustancias a ensayar.

Como parámetro para determinar la toxicidad de las sustancias, se utilizó la concentración efectiva 50 y 100 (EC50 y EC100). El valor EC50 y el valor EC100 indicaron la concentración de la sustancia que provocó un 50 % y un 100 % de inhibición en la bioluminiscencia de la bacteria *V. fischeri*, respectivamente. Para

conocer este valor, a partir del porcentaje de extinción de la bioluminiscencia, se realizó una gráfica representando el porcentaje de disminución de bioluminiscencia respecto a la concentración de la sustancia. Para el cálculo de la ecuación de la recta se descartaron los valores que dieron un 100 % de inhibición o un 0 % de inhibición. Con esta ecuación se calculó la EC50 (concentración de sustancia ensayada que produce el 50 % de disminución de luminiscencia).

2.5. Detección de actividad *quorum quenching* de las sustancias ensayadas

Muchos de los factores de virulencia en *V. harveyi* están regulados por *quorum sensing*. Igualmente la bioluminiscencia generada por *V. fischeri* está también regulada por mecanismos de *quorum sensing*. Este es un mecanismo de regulación genérico usado por bacterias Gram negativas y Gram positivas que depende de la densidad poblacional (Fuqua *et al.*, 1996). Mediante este mecanismo las bacterias patógenas son capaces de detectar un número umbral de bacterias en el ambiente a partir del cual empiezan a sintetizar factores de virulencia. Su inhibición ha sido ya propuesta para intentar disminuir la virulencia de bacterias patógenas, este mecanismo es llamado *quorum quenching*.

Para poner de manifiesto la existencia de acil-homoserina lactona (AHL) en el medio, molécula señal de muchas bacterias gram negativas, se usó como biosensor a *Chromobacterium violaceum* NCTC 13278. Esta cepa es mutante para la producción de AHLs y por tanto, es deficiente en la producción del pigmento violaceína. Sin embargo es capaz de detectar la AHL, por lo que la producción de violaceína se restaura mediante la adicción exógena de AHLs.

En primer lugar se sembró *C. violaceum* en agar LB con kanamicina (25 mg L⁻¹) y se dejó incubar durante 24 h a 22 °C. Posteriormente se prepararon las diluciones de los distintos extractos. Este ensayo se realizó con el ajo, y con los aceites de clavo, de citronella, de aloysia y del árbol del té.

Partiendo de una concentración mayor que la concentración mínima inhibitoria (calculada previamente), se realizaron diluciones seriadas 1:10 hasta la dilución 1:10.000, usando solución salina estéril al 2 % de NaCl como diluyente. Las

concentraciones de partida para este ensayo fueron de $10 \mu\text{L mL}^{-1}$ para el aceite de clavo; de $50 \mu\text{L mL}^{-1}$ para el aceite de aloysia, de citronella y del árbol del té y de $4000 \mu\text{g mL}^{-1}$ para el ajo.

A continuación se suspendió un cultivo de *V. fischeri* (previamente crecido en placa durante 24 h) en solución salina al 2 % de NaCl, hasta alcanzar una turbidez similar al 0,5 de McFarland. Posteriormente se mezclaron $20 \mu\text{L}$ de la suspensión bacteriana y $980 \mu\text{L}$ de cada dilución en tubos Eppendorf de $1,5 \text{ mL}$ y se dejaron agitando a 150 rpm a temperatura ambiente durante 24 h.

Una vez pasado el tiempo de incubación, para observar el crecimiento y la bioluminiscencia de *V. fischeri*, se depositó una gota de $10 \mu\text{L}$ de la mezcla de la sustancia y la bacteria en la superficie de una placa de TSAs. Todas las placas fueron incubadas a 22°C durante 24 h. Se anotaron las concentraciones a las cuales hubo crecimiento bacteriano y a las cuales se inhibió la bioluminiscencia. Para ver si existía una inhibición de la bioluminiscencia las placas se observaron en oscuridad.

Para comprobar el efecto de *quorum quenching* se sembró *C. violaceum* sobre agar LB con kanamicina con un hisopo estéril. Sobre la superficie de la placa se depositó una gota de $10 \mu\text{L}$ de la mezcla de la sustancia y la bacteria, dejándose secar. Los resultados se observaron a las 48 h. Si la bacteria produjo AHL a pesar de la presencia de las sustancias ensayadas, aparecerá una mancha violeta donde se depositó la gota. Si la sustancia impidió la producción de AHL o lo degradó (efecto *quorum quenching*) la superficie aparecerá incolora.

Para contrastar que el efecto *quorum quenching* se produjo por la degradación del AHL y no porque el número de células de *V. fischeri* en la placa sea menor que el necesario para producir *quorum sensing* se hizo un ensayo de microtitulación.

Para la microtitulación se emplearon la concentración menor a la que no había crecimiento de *V. fischeri*, todas las concentraciones que habían degradado el AHL y la concentración mayor a la que se producía AHL. Estas concentraciones fueron: 4000 , 400 y $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ para el ajo; 10 , 1 y $0,1 \mu\text{L mL}^{-1}$ para el aceite de clavo; 5 , $0,5$, $0,05$ y $0,005 \mu\text{L mL}^{-1}$ para el árbol del té y 5 , $0,5$ y $0,05 \mu\text{L mL}^{-1}$ para el aceite de aloysia. Además se utilizó un control únicamente con solución salina estéril al 2 % de NaCl.

Seguidamente se mezclaron 20 μL de la suspensión bacteriana de *V. fischeri* (previamente crecido en placa durante 24 h y suspendida en solución salina) y 980 μL de cada dilución en viales Eppendorf de 1,5 mL y se dejaron agitando a 150 rpm a temperatura ambiente durante 24 h. Pasado el tiempo de incubación, de cada tubo Eppendorf se hizo una batería de diluciones seriadas 1:10 desde la normal hasta la dilución 10^{-5} . Finalmente, sobre placas de TSAs se depositaron dos gotas de 10 μL de cada dilución. Todas las placas fueron incubadas a 22 °C durante 24 h.

A las 24 h se realizó el conteo de colonias que habían crecido en cada placa. A partir de estos valores, se calculó el número de unidades formadoras de colonias (UFC) por mL a partir de la siguiente ecuación: (n° de colonias \cdot volumen inoculado $^{-1}$ \cdot dilución ensayada $^{-1}$).

2.6. Estabilidad de las sustancias a distintas temperaturas y tiempos de almacenaje

Para observar si el efecto de las sustancias inhibitorias perdura a lo largo del tiempo almacenado a diferentes temperaturas (60 °C, 37 °C, 22 °C y 4 °C) se repitió el procedimiento descrito en el apartado 2.3., solamente utilizando el ajo y el aceite de clavo a las mismas concentraciones que en el apartado 2.3.

Una vez realizada la preparación de los extractos y las diluciones, se conservaron en viales Eppendorf durante 1, 3 y 7 días a las temperaturas citadas previamente. Seguidamente se suspendió masa bacteriana de *V. fischeri* (crecida en TSAs durante 24 h) en solución salina a D.O. de 0,5 a 600 nm. Con un hisopo estéril se sembró la superficie de una placa de TSAs, pasándola uniformemente por toda la superficie para obtener un césped bacteriano.

Una vez sembradas las placas, se realizaron una serie de orificios en la superficie del agar utilizando la boca de una pipeta Pasteur esterilizada. Los pocillos debían estar lo bastante separados entre ellos para que no se superpusiesen sus zonas de inhibición. En cada pocillo se depositó 75-100 μL de cada extracto (de la normal hasta la 1:64) hasta enrasar el pocillo. Como control negativo se utilizó solución salina estéril. En el caso del aceite de clavo se debió agitar bien la solución para que no se generasen dos fases. Todas las placas fueron incubadas a 22 °C durante 24 h. Transcurrido el tiempo

de incubación se analizó la presencia/ausencia de halo de inhibición alrededor de cada pocillo. Se tomó como concentración mínima inhibitoria a la concentración más baja de las ensayadas que generó inhibición del crecimiento bacteriano.

2.7. Estabilidad de las sustancias al ser adicionadas al pienso

Se estudió la persistencia de la actividad de las sustancias después de ser administrada en el alimento de los peces (pienso comercial) en el caso de que estas sustancias se administrasen por vía oral. La estabilidad en el pienso solo se ensayó con el ajo y con el aceite de clavo. El procedimiento llevado a cabo consistió en añadir distintas cantidades de las sustancias a ensayas al pienso, y comprobar si las sustancias adicionadas seguían conservando capacidad de inhibición del crecimiento bacteriano.

Para ello se utilizó pienso comercial (Skreeting) para doradas de 100 g de peso. Los piensos se esterilizaron en autoclave. Una vez esterilizados se pesaron 5 g de pienso y se rociaron con 1 mL de las distintas concentraciones ensayadas. Para este ensayo las concentraciones utilizadas fueron de 200, 100, 50 y 25 mg mL⁻¹ de ajo y de 400, 200, 100 y 50 µL mL⁻¹ de aceite de clavo.

A continuación se resuspendió esta mezcla en 10 mL de solución salina estéril al 2 % de NaCl, obteniéndose unas concentraciones finales de 20, 10, 5 y 2,5 mg mL⁻¹ de ajo y de 40, 20, 10 y 5 µL mL⁻¹ de aceite de clavo. Por último, se hizo pasar el extracto acuoso resultante por una malla de 100 µm de diámetro de poro.

Con un hisopo estéril se sembró un inóculo de *V. fischeri* (con una turbidez similar al 0,5 de la escala McFarland), sobre la superficie de una placa de TSAs, pasándolo uniformemente por toda la superficie para obtener un césped bacteriano.

Una vez sembradas las placas, utilizando la boca de una pipeta Pasteur esterilizada, se realizaron una serie de orificios en la superficie del agar. En cada pocillo se depositó 100 µL de cada extracto. Como control se utilizó un pocillo donde se añadió solución salina. Todas las placas fueron incubadas a 22 °C durante 24 h. Tras la incubación, se observaron las placas para ver si había inhibición del crecimiento y de la bioluminiscencia, o por el contrario, las sustancias habían perdido su capacidad.

3. RESULTADOS

3.1. Capacidad inhibitoria del crecimiento bacteriano de los extractos

Las Tablas 3 y 4 recogen los resultados de la CMI (en mg mL^{-1} y en $\mu\text{L mL}^{-1}$) a la que el extracto inhibió el crecimiento bacteriano de *Vibrio harveyi*, *Aeromonas hydrophila*, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* y *Vibrio fischeri* por el método de pocillos y por el de discos de papel.

No se observó inhibición del crecimiento bacteriano a las concentraciones ensayadas utilizando laurel, lavanda, romero, salvia, tomillo, orégano, *Laminaria japonica*, *Hydropuntia cornea*, *Spirullina platensis* y *Ulva sp.* Por tanto, estas sustancias no se utilizaron para los sucesivos ensayos.

En los ensayos con solución salina (Tabla 3), el ajo inhibió el crecimiento de *A. hydrophila* a una concentración de $6,25 \text{ mg mL}^{-1}$ y el aceite de aloesia y de clavo a una concentración de $31,25 \mu\text{L mL}^{-1}$ (Figura 2).

El ajo y el aceite de clavo fueron las sustancias que inhibieron a *V. harveyi* y *V. fischeri* a una concentración más baja (ambos inhibieron en la dilución 1:64, que se corresponden con una concentración de $3,1 \text{ mg mL}^{-1}$ y $7,8 \mu\text{L mL}^{-1}$, respectivamente) (Figura 2).

Estas mismas sustancias también fueron las que presentaron menor CMI al inhibir el crecimiento de *P. damsela* subsp. *piscicida*. El ajo la inhibió a una concentración de $6,3 \text{ mg mL}^{-1}$ y el aceite de clavo a una concentración de $7,81 \mu\text{L mL}^{-1}$.

Tabla 3. Inhibición del crecimiento bacteriano por el método de pocillos (sustancias suspendidas en solución salina). Se representa la concentración mínima de extracto que inhibe el crecimiento bacteriano, expresada en mg mL⁻¹, excepto para el aceite de citronella, aloysia, árbol del té y clavo (representado en µL mL⁻¹). (-): Ausencia de halo de inhibición del crecimiento bacteriano. NT: No Testado.

Extractos	V. <i>harveyi</i>	A. <i>hydrophila</i>	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	V. <i>fischeri</i>
Laurel (<i>Laurus nobilis</i>)	-	-	-	-
Ajo (<i>Allium sativum</i>)	≤3,13	6,25	6,25	≤3,13
Calistemo (<i>Callistemon citrinus</i>)	50	50	25	NT
Mirto (<i>Myrtus communis</i>)	12,5	12,5	25	NT
Lavanda (<i>Lavandula angustifolia</i>)	-	-	-	NT
Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	-	-	-	NT
Salvia (<i>Salvia grahamii</i>)	-	-	-	NT
Tomillo (<i>Thymus mastichina</i>)	-	-	-	NT
Orégano (<i>Plectranthus amboinicus</i>)	-	-	-	NT
Aceite de citronella (<i>Cymbopogon citratus</i>)	31,25	62,5	31,25	31,25
Aceite de aloysia (<i>Aloysia citriodora</i>)	31,25	31,25	31,25	31,25
Aceite de árbol del té (<i>Melaleuca alternifolia</i>)	31,25	125	31,25	31,25
Aceite de clavo (<i>Syzygium aromaticum</i>)	≤7,81	31,25	≤7,81	≤7,81
<i>Hydropuntia cornea</i>	-	-	-	NT
<i>Laminaria japonica</i>	-	-	-	NT
<i>Spirulina platensis</i>	-	-	-	NT
<i>Ulva</i> sp.	-	-	-	NT

En los ensayos con etanol (Tabla 4), en general la CMI de los extractos fue menor que en los ensayos con solución salina. El calistemo no presentó capacidad inhibitoria, y el ajo y el mirto inhibieron en la dilución 1:2 (concentración de 100 mg mL^{-1}). El aceite de aloysia y de clavo son las sustancias que inhibieron todas las bacterias a una concentración más baja (ambos inhibieron en la dilución 1:32, que se corresponde con una concentración de $15,63 \text{ } \mu\text{L mL}^{-1}$) (Figura 2).

Tabla 4. Inhibición del crecimiento bacteriano usando discos de papel (sustancias disueltas en etanol). Se representa la concentración mínima de extracto que inhibe el crecimiento bacteriano, expresada en mg mL^{-1} , excepto para el aceite de citronella, aloysia, árbol del té y clavo (representado en $\mu\text{L mL}^{-1}$). (-): Ausencia de halo de inhibición del crecimiento bacteriano. NT: No Testado.

Extractos	V. <i>harveyi</i>	A. <i>hydrophila</i>	<i>P. damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	V. <i>fischeri</i>
Laurel (<i>Laurus nobilis</i>)	-	-	-	NT
Ajo (<i>Allium sativum</i>)	100	100	100	NT
Calistemo (<i>Callistemon citrinus</i>)	-	-	-	NT
Mirto (<i>Myrtus communis</i>)	100	-	-	NT
Lavanda (<i>Lavandula angustifolia</i>)	-	-	-	NT
Romero (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)	-	-	-	NT
Salvia (<i>Salvia grahamii</i>)	-	-	-	NT
Tomillo (<i>Thymus mastichina</i>)	-	-	-	NT
Orégano (<i>Plectranthus amboinicus</i>)	-	-	-	NT
Aceite de citronella (<i>Cymbopogon citratus</i>)	125	31,25	31,25	NT
Aceite de aloysia (<i>Aloysia citriodora</i>)	15,63	15,63	15,63	NT
Aceite de árbol del té (<i>Melaleuca alternifolia</i>)	125	125	31,25	NT

Aceite de clavo (<i>Syzygium aromaticum</i>)	15,63	15,63	15,63	NT
<i>Hydropuntia cornea</i>	-	-	-	NT
<i>Laminaria japonica</i>	-	-	-	NT
<i>Spirullina platensis</i>	-	-	-	NT
<i>Ulva</i> sp.	-	-	-	NT

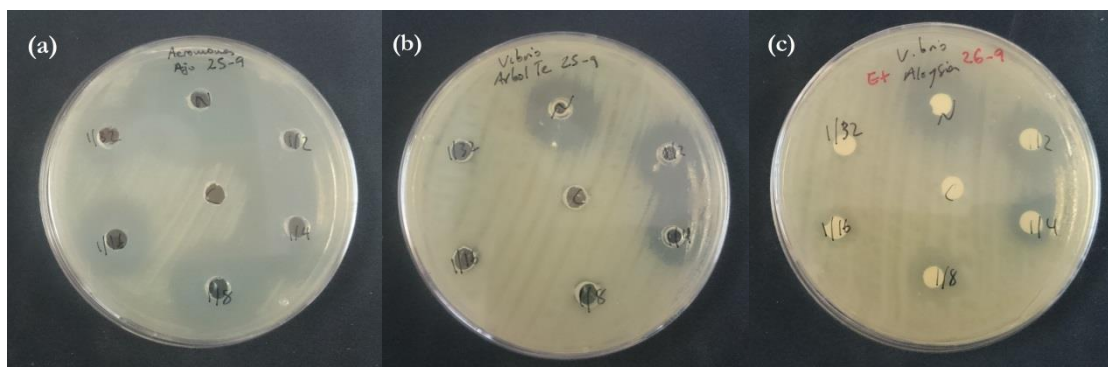


Figura 2. Halos de inhibición producidos por las sustancias ensayadas. Inhibición del crecimiento bacteriano producida por (a) ajo en *Aeromonas hydrophila*, (b) aceite del árbol del té en *Vibrio harveyi*, y (c) aceite de aloysia en *V. harveyi*.

3.2. Capacidad de inhibición de la bioluminiscencia de *V. fischeri*

3.2.1. Inhibición de la bioluminiscencia en presencia de aceite de aloysia

Los resultados obtenidos mostraron que a unas concentraciones muy bajas de la sustancia (entre 0,0006 y 0,0195 $\mu\text{L mL}^{-1}$) hubo un aumento de la bioluminiscencia respecto al control. A partir de una concentración de 0,0391 $\mu\text{L mL}^{-1}$, el porcentaje de inhibición de la bioluminiscencia empezó a crecer rápidamente, llegando al 100 % de la extinción cuando la concentración del aceite de aloysia fue de 2,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (Figura 3).

Para el cálculo de la EC50 se tuvieron en cuenta los valores que van desde 0,0391 $\mu\text{L mL}^{-1}$ a 1,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$. La gráfica se asemeja a una función logarítmica, con valores:

$$y = 27,48 \times \text{LN}(x) + 99,72$$

$$R^2 = 0,97$$

Por lo tanto el valor de su EC50 fue de 0,1637 $\mu\text{L mL}^{-1}$ y su EC100 de 2,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$.

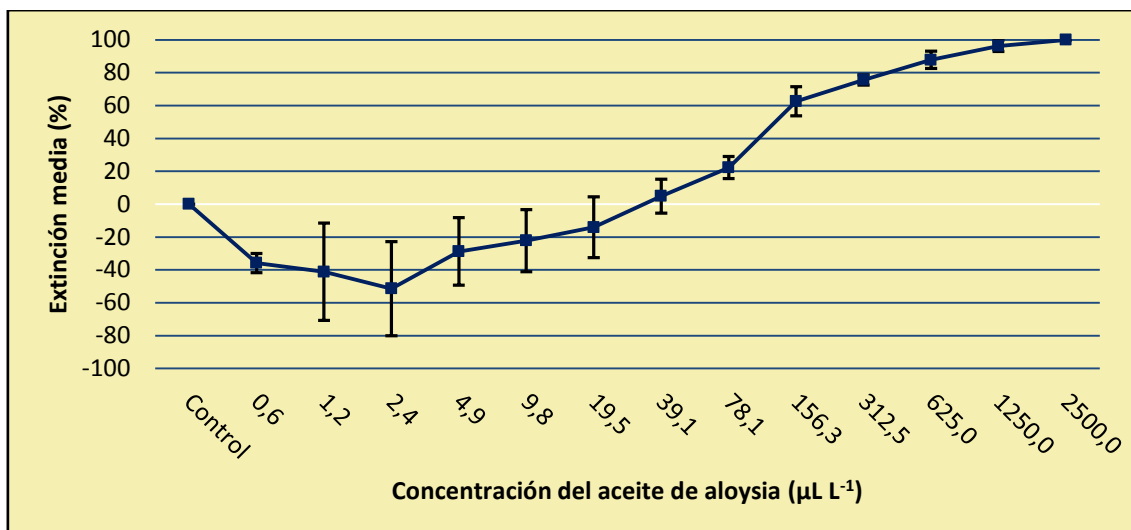


Figura 3. Porcentaje de extinción de luminiscencia de *V. fischeri* a concentraciones crecientes de aceite de alaysia.

3.2.2. Inhibición de la bioluminiscencia en presencia de aceite de clavo

En el caso del aceite de clavo, se vio como a unas concentraciones muy bajas de la sustancia (entre 0,0006 y 0,0098 µL mL⁻¹) aumentó la bioluminiscencia. A medida que la concentración aumentaba empezó a producirse la inhibición de la bioluminiscencia, llegando al 100 % de la extinción cuando la concentración del aceite de clavo era de 0,625 µL mL⁻¹ (Figura 4).

Se tuvieron en cuenta los valores que van desde 0,0195 µL mL⁻¹ a 0,3125 µL mL⁻¹. Su gráfica se asemeja a una función logarítmica, cuyos valores son:

$$y = 28,83 \times \text{LN}(x) + 131,55$$

$$R^2 = 0,95$$

Por lo tanto el valor de su EC50 fue de 0,059 µL mL⁻¹ y su EC100 de 0,625 µL mL⁻¹.

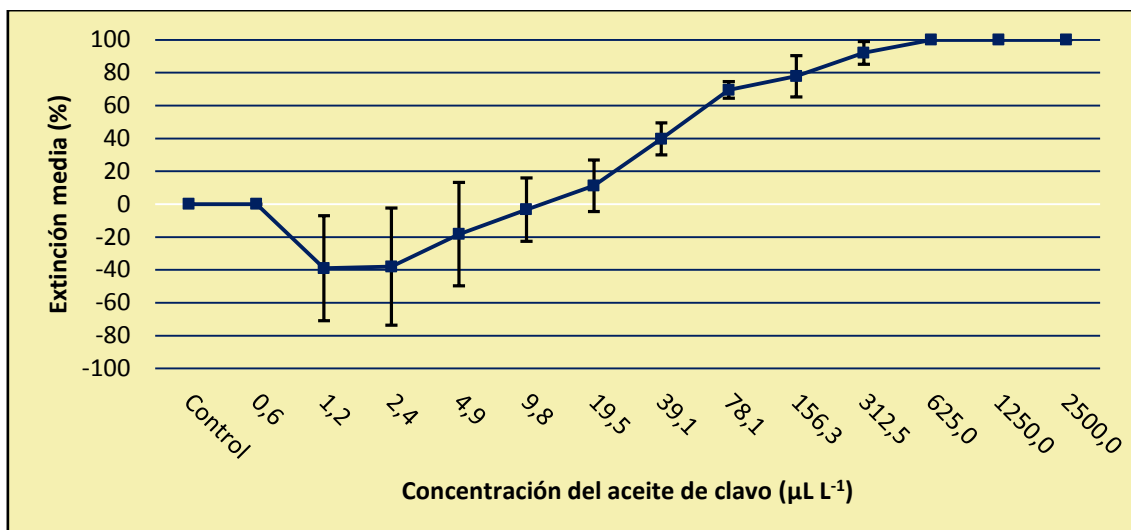


Figura 4. Porcentaje de extinción de luminiscencia de *V. fischeri* a concentraciones crecientes de aceite de clavo.

3.2.3. Inhibición de la bioluminiscencia en presencia de ajo

A unas concentraciones bajas de ajo (entre 400 y 1.000 µg mL⁻¹) se favoreció la bioluminiscencia. A partir de una concentración de 1142,9 µg mL⁻¹ empezó a producirse la inhibición de la bioluminiscencia, llegando al 100 % de extinción cuando la concentración de ajo era de 20.000 µg mL⁻¹ (Figura 5).

Si se tienen en cuenta los valores que van desde 1.142,857 µg mL⁻¹ a 8.000 µg mL⁻¹, su gráfica se asemeja a una función logarítmica, cuyos valores son:

$$y = 50,41 \times \text{LN}(x) - 340,37$$

$$R^2 = 0,87$$

Por lo tanto el valor de su EC50 fue de 2.306 µg mL⁻¹ y su EC100 de 20.000 µg mL⁻¹.

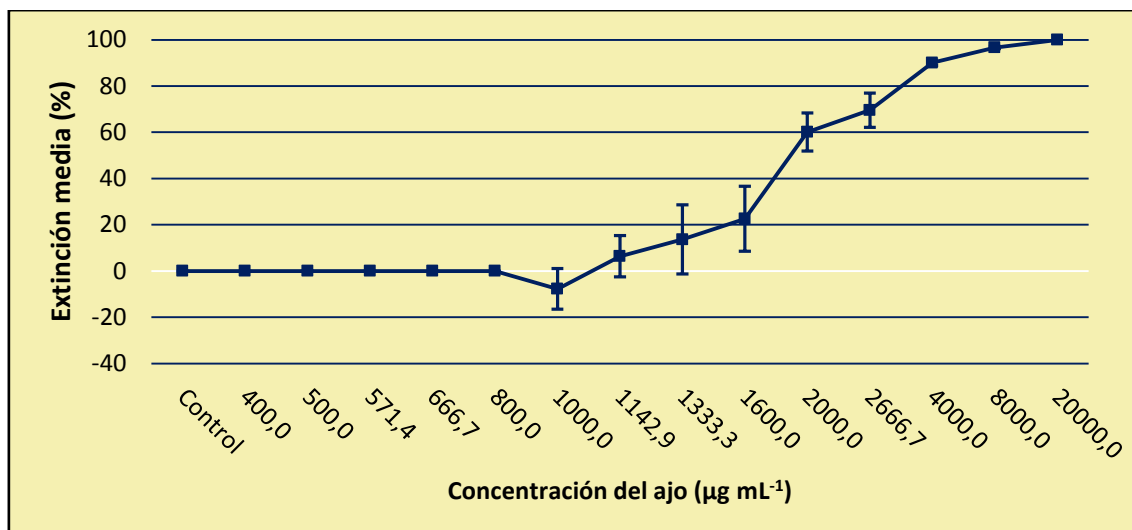


Figura 5. Porcentaje de extinción de luminiscencia de *V. fischeri* a concentraciones crecientes de ajo.

3.2.4. Inhibición de la bioluminiscencia en presencia de aceite del árbol del té

En cuanto al aceite del árbol del té los resultados muestran que a unas concentraciones muy bajas de la sustancia (entre 0,156 y 0,278 µL mL⁻¹) la bioluminiscencia de *V. fischeri* aumentó. A medida que la concentración aumentaba empezó a producirse la inhibición de la bioluminiscencia, llegando al 100 % de la extinción cuando la concentración del aceite del árbol del té era de 1,6667 µL mL⁻¹ (Figura 6).

Si se tienen en cuenta los valores que van desde 0,3125 µL mL⁻¹ a 1,25 µL mL⁻¹, su gráfica se asemeja a una función logarítmica, cuyos valores son:

$$y = 50,95 \times \ln(x) + 87,02$$

$$R^2 = 0,85$$

Por lo tanto el valor de su EC50 fue de 0,4835 µL mL⁻¹ y su EC100 de 1,6667 µL mL⁻¹.

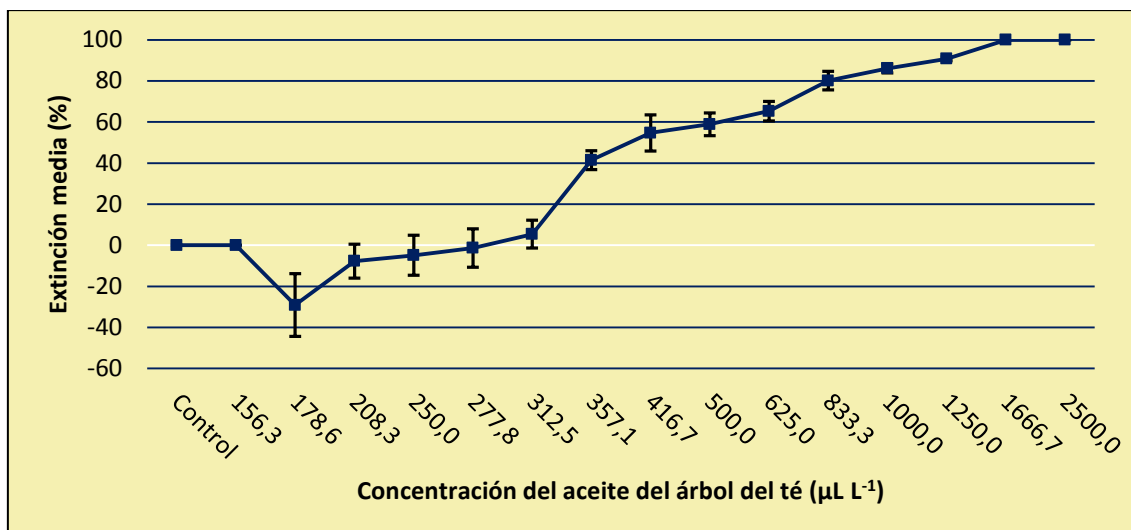


Figura 6. Porcentaje de extinción de luminiscencia de *V. fischeri* a concentraciones crecientes de aceite de árbol del té.

3.2.5. Inhibición de la bioluminiscencia en presencia de aceite de citronella

En el caso del aceite de citronella, a unas concentraciones bajas de la sustancia (entre 0,1563 y 0,3571 µL mL⁻¹) se favoreció la bioluminiscencia. A partir de una concentración de 0,416 µL mL⁻¹ el porcentaje de extinción empezó a crecer rápidamente, llegando al 100 % de la extinción cuando la concentración del aceite de citronella era de 2,5 µL mL⁻¹ (Figura 7).

Si se tienen en cuenta los valores que van desde 0,4167 µL mL⁻¹ a 1,6667 µL mL⁻¹, su gráfica se asemeja a una función logarítmica, cuyos valores son:

$$y = 57,44 \times \ln(x) + 65,27$$

$$R^2 = 0,97$$

Por lo tanto el valor de su EC50 fue de 0,766 µL mL⁻¹ y su EC100 de 2,5 µL mL⁻¹.

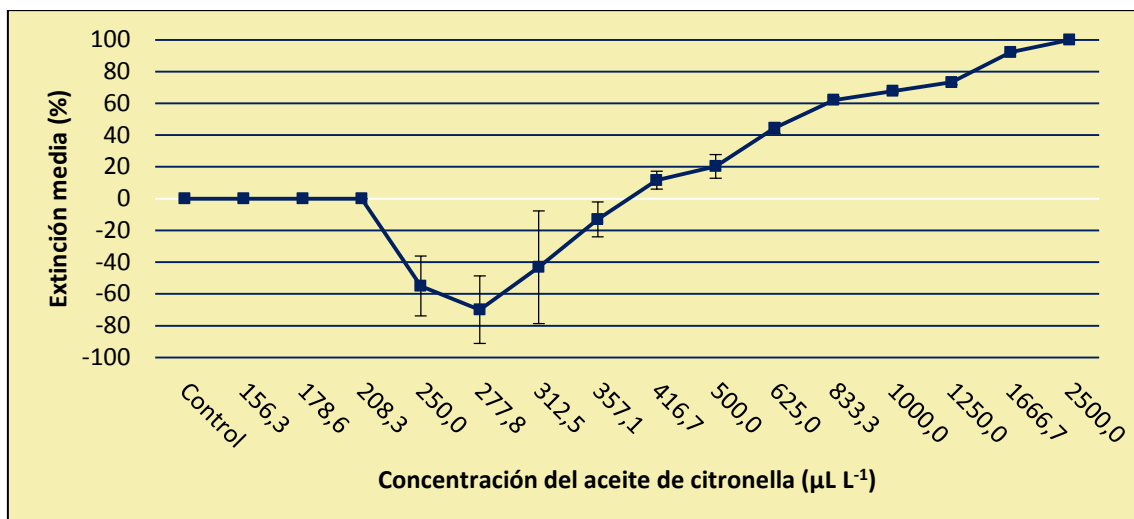


Figura 7. Porcentaje de extinción de luminiscencia de *V. fischeri* a concentraciones crecientes de aceite de citronella.

3.3. Detección de actividad *quorum quenching* de las sustancias ensayadas

Se observó actividad *quorum quenching* en todos los casos excepto en el aceite de citronella (Figura 8). El aceite del árbol del té fue la sustancia que produjo *quorum quenching* a una concentración más baja ($0,05 \mu\text{L mL}^{-1}$). El ajo mostró actividad *quorum quenching* a una concentración de $400 \mu\text{g mL}^{-1}$. Por su parte, el aceite de aloysia y el aceite de clavo degradan el AHL a una concentración de $0,5$ y $1 \mu\text{L mL}^{-1}$ respectivamente (Tabla 5).

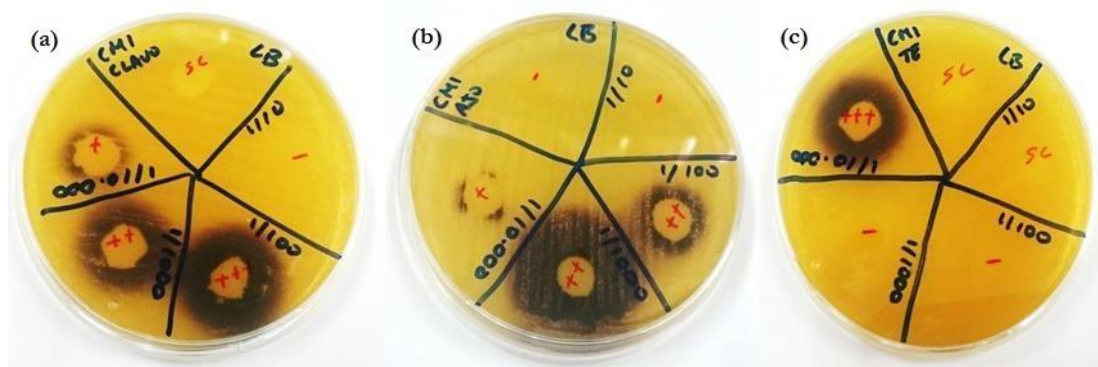


Figura 8. Efecto *quorum quenching* por parte de las sustancias ensayadas. En la imagen, de izquierda a derecha: (a) aceite de clavo, (b) ajo, y (c) aceite del árbol del té. Las placas están sembradas con *C. violaceum*. Sobre la superficie se ha puesto cultivos de *V. fischeri* incubados con distintas concentraciones de la sustancia ensayada. La aparición de un halo violeta muestra la presencia de AHL en el cultivo, producido por *V. fischeri*. En las zonas donde no aparece halo violeta, la sustancia ensayada ha interferido en la producción de AHL o lo ha degradado.

Tabla 5. Inhibición del *quorum sensing* por parte de las sustancias ensayadas y comparación con los datos obtenidos de inhibición del crecimiento bacteriano y con los ensayos de inhibición de la bioluminiscencia de *V. fischeri*. CMI: concentración mínima inhibitoria del crecimiento bacteriano; EC50: concentración de sustancia que inhibe el 50 % de la bioluminiscencia de *V. fischeri*; EC100: concentración mínima de la sustancia que inhibe el 100 % de la bioluminiscencia de *V. fischeri*. Todos los datos están expresados en $\mu\text{L mL}^{-1}$, excepto el ajo (representado en $\mu\text{g mL}^{-1}$).

	Ac. Aloysia	Ac. Citronella	Ac. Árbol del té	Ac. Clavo	Ajo
CMI	50	50	50	10	4000
EC50	0,164	0,767	0,484	0,059	2306
EC100	2,5	2,5	1,667	0,625	20000
Quorum Quenching	0,5	-	0,05	1	400
Sin Crecimiento	5	5	5	10	-

Para comprobar que el efecto *quorum quenching* se produjo por la degradación del AHL y no porque el número de células de *V. fischeri* en la placa sea menor que el necesario para producir *quorum sensing* se hizo un ensayo de microtitulación (Tabla 6).

Tabla 6. Recuento de unidades formadoras de colonias de *V. fischeri* en presencia de distintas concentraciones de las sustancias ensayadas y comparación con los datos obtenidos de la inhibición del *quorum sensing* y del crecimiento de *V. fischeri*. SC: Ausencia de crecimiento

Sustancias ensayadas	Concentración	Título (UFC·mL ⁻¹)	QQ	Crecimiento
Control		$1,5 \times 10^7$		
Aceite de aloysia	0,05 $\mu\text{L mL}^{-1}$	$2,6 \times 10^6$	+	+
	0,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$	SC	-	+
	5 $\mu\text{L mL}^{-1}$	SC	SC	-
Aceite del árbol del té	0,005 $\mu\text{L mL}^{-1}$	$1,1 \times 10^7$	+++	+
	0,05 $\mu\text{L mL}^{-1}$	2×10^5	-	+
	0,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$	SC	-	-
	5 $\mu\text{L mL}^{-1}$	SC	SC	-
Aceite de clavo	0,1 $\mu\text{L mL}^{-1}$	$2,6 \times 10^6$	+++	+
	1 $\mu\text{L mL}^{-1}$	SC	-	-
	10 $\mu\text{L mL}^{-1}$	SC	SC	-
Ajo	40 $\mu\text{g mL}^{-1}$	$1,8 \times 10^7$	++	+
	400 $\mu\text{g mL}^{-1}$	$2,5 \times 10^7$	-	+
	4000 $\mu\text{g mL}^{-1}$	$2,6 \times 10^7$	-	+

El recuento de colonias (UFC) mostró como, en comparación con el control, ni el ajo (en todas las concentraciones estudiadas) ni el aceite del árbol del té a $0,005 \mu\text{L mL}^{-1}$ eliminaron las células de *V. fischeri*.

De distinto modo, tanto el aceite de clavo a $0,1 \mu\text{L mL}^{-1}$ como el aceite de aloysia y del árbol del té a $0,05 \mu\text{L mL}^{-1}$ redujeron el número de colonias respecto al control.

3.4. Estabilidad de las sustancias a distintas temperaturas y tiempos de almacenaje

El almacenamiento del ajo a temperaturas más bajas permitió que mantuviera su capacidad de formar halos de inhibición. Se observó que la concentración mínima inhibitoria del ajo respecto a *V. fischeri* aumentó, y que, a partir del tercer día, a 63°C perdió casi por completo su capacidad inhibitoria (Tabla 7).

Tabla 7. Inhibición por el **ajo**, almacenado durante 1, 3 y 7 días a distintas temperaturas, sobre *V. fischeri*. Se representa la concentración mínima (en mg mL^{-1}) a la que el extracto inhibe el crecimiento bacteriano.

Días	Temperatura			
	4 °C	22 °C	37 °C	63 °C
1	$\leq 3,13$	6,25	12,5	100
3	6,25	6,25	12,5	-
7	6,25	6,25	12,5	-

En el caso del aceite de clavo no hubo variación significativa en la estabilidad de la sustancia lo largo del tiempo (se mantuvo la capacidad inhibitoria hasta el día 7) y no se observó mayor actividad de la sustancia según la temperatura de almacenamiento. Para el aceite de clavo la concentración mínima inhibitoria se mantiene (Tabla 8).

Tabla 8. Inhibición del aceite de clavo, almacenado durante 1, 3 y 7 días a distintas temperaturas, sobre *V. fischeri*. Se representa la concentración mínima (en $\mu\text{L mL}^{-1}$) a la que el extracto inhibe el crecimiento bacteriano.

Temperatura				
Días	4 °C	22 °C	37 °C	63 °C
1	$\leq 7,81$	$\leq 7,81$	$\leq 7,81$	$\leq 7,81$
3	$\leq 7,81$	$\leq 7,81$	$\leq 7,81$	$\leq 7,81$
7	$\leq 7,81$	$\leq 7,81$	$\leq 7,81$	$\leq 7,81$

3.5. Estabilidad de las sustancias tras ser adicionadas al pienso

El ajo mantuvo su capacidad de inhibición del crecimiento bacteriano y de la bioluminiscencia de *V. fischeri* a una concentración de 20 mg mL^{-1} de ajo (Tabla 9).

En cuanto al aceite de clavo, las concentraciones que en las que hubo inhibición del crecimiento y de la bioluminiscencia de *V. fischeri* fueron 40, 20 y $10 \mu\text{L mL}^{-1}$. Concentraciones más bajas de ajo y de aceite de clavo no tuvieron efecto inhibitorio ni sobre el crecimiento bacteriano ni sobre la bioluminiscencia de la bacteria.

Tabla 9. Inhibición del crecimiento bacteriano y de la bioluminiscencia de *V. fischeri* por parte de las sustancias ensayadas tras ser adicionadas al pienso. Se representa la concentración mínima que inhibe el crecimiento bacteriano y la bioluminiscencia.

Sustancias ensayadas	Inhibición del crecimiento	Inhibición de la bioluminiscencia
Ajo	20 mg mL^{-1}	20 mg mL^{-1}
Aceite de clavo	$10 \mu\text{L mL}^{-1}$	$10 \mu\text{L mL}^{-1}$

4. DISCUSIÓN

Como se ha comentado a lo largo del TFM, la mala gestión en el uso de agentes antimicrobianos, principalmente debido al uso abusivo de compuestos químicos, en el control de enfermedades en la acuicultura ha provocado severos impactos ambientales. Y, además, ha originado resistencia en bacterias inocuas y patógenas, algunas de ellas patógenas en humanos, lo que supone un riesgo para la salud pública.

Es por esto que se hace necesario desarrollar nuevos químicos alternativos que tengan un menor impacto en los peces, en el medio ambiente y en los consumidores. Además, la producción ecológica regulada a nivel europeo otorga preferencia a los productos fitoterapéuticos frente a los tradicionales –como los antibióticos– en el tratamiento de enfermedades. Y es en el marco de esta búsqueda por lo que se ha llevado a cabo este trabajo, con el fin de conocer los comportamientos como posibles agentes antimicrobianos de una serie de sustancias naturales.

Se ha demostrado mediante métodos *in vivo* e *in vitro* que los extractos de plantas inhiben el crecimiento bacteriano en mayor o menor grado (Hammer *et al.*, 1999; Burt y Reinders, 2003; Yin *et al.*, 2009; Awad y Austin, 2010; Adel *et al.*, 2016).

Sin embargo, los resultados de diferentes estudios entre las mismas y entre distintas sustancias naturales son difíciles de comparar. Esto se debe principalmente a los distintos métodos de prueba, cepas bacterianas y fuentes de muestras antimicrobianas utilizadas. Además, la composición de los extractos de plantas y de especias puede variar considerablemente según la región geográfica, las propiedades del suelo, la temperatura a la que ha sido cultivada, la variedad, el método de secado y el método de extracción (Aligiannis *et al.*, 2001; Runyoro *et al.*, 2010).

Además, no todas las bacterias tienen la misma sensibilidad a las distintas sustancias inhibitorias o antibacterianas. Evaluar esta sensibilidad es un factor clave a la hora de seleccionar el compuesto más adecuado para el tratamiento de las enfermedades bacterianas en la acuicultura.

4.1. Capacidad inhibitoria del crecimiento bacteriano de los extractos

Esto es lo que se ha comprobado en el primer experimento del presente TFM. Los resultados de los ensayos de inhibición, tanto en pocillos como en discos de papel, señalaron que, a las concentraciones ensayadas, no se observó inhibición del crecimiento bacteriano con: laurel, lavanda, romero, salvia, tomillo, orégano, *Laminaria japonica*, *Hydropuntia cornea*, *Spirullina platensis* y *Ulva sp.* Por este motivo, estas sustancias no se utilizaron en los sucesivos ensayos.

Nuestros resultados difieren con algunos trabajos publicados. Tsai *et al.* (2007) investigaron los efectos *in vitro* del extracto de romero frente a *Streptococcus sobrinus*, y mostraron inhibición sobre la bacteria, siendo la CMI del extracto acuoso y metanólico del romero frente a *S. sobrinus* de 16 y 4 mg mL⁻¹ respectivamente. Aligiannis *et al.* (2001) encontraron que los aceites esenciales de distintas especies de orégano presentaban actividad antimicrobiana contra las bacterias Gram negativas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter cloacae*; las Gram positivas *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis*, y los hongos patógenos *Candida albicans*, *Candida tropicalis* y *Torulopsis glabrata*., estableciéndose la concentración mínima inhibitoria (CMI) para los aceites esenciales de *Origanum scabrum* entre 0,28-1,27 mg mL⁻¹ para bacterias, y entre 0,65-1,27 mg mL⁻¹ para los hongos patógenos. De Rapper *et al.* (2013) investigaron las propiedades antimicrobianas de aceites esenciales de lavanda frente a distintos patógenos, siendo su capacidad mínima inhibitoria de 2 mg mL⁻¹ para *Enterococcus faecalis*, *P. aeruginosa*, *S. epidermidis* *S. aureus* y de 1,5 mg mL⁻¹ para *K. pneumoniae*. Por otra parte, Celikel y Navas (2008) realizaron un estudio donde se comprobaba el efecto antimicrobiano de aceites esenciales provenientes del tomillo, la salvia, y el laurel. Todos ellos inhibieron el crecimiento de *E. coli*, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus* y *C. albicans*. La susceptibilidad de la bacteria a los aceites esenciales, determinado por el método de difusión por agar, mostró que aquellos con efectos inhibitorios mayores producían zonas de inhibición de 20-25 mm de diámetro. Además la zona de inhibición aumentaba a medida que aumentaba la concentración del extracto, siendo en elevadas concentraciones (20 µL mL⁻¹) la del tomillo mayor que las otras. Por otra parte, todas las bacterias, aunque fueron inhibidas, presentaron baja susceptibilidad al

laurel comparadas con los mismos niveles de tomillo y salvia. Además, los extractos de tomillo y salvia mostraron una gran efectividad frente a *C. albicans*.

En nuestro estudio, de los extractos obtenidos en fresco, el ajo fue la sustancia natural más susceptible de inhibir el crecimiento de los patógenos. En los ensayos con solución salina (Tabla 3), el ajo inhibió a *Vibrio harveyi* y *Vibrio fischeri* a una concentración más baja que a la que inhibió el crecimiento de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* y de *Aeromonas hydrophila*. En las diluciones con etanol, en general la CMI de los extractos fue menor que en los ensayos con solución salina. A su vez, la CMI del ajo diluido en etanol aumentó de forma considerable respecto a cuándo es diluido en solución salina. Este aumento de la CMI del ajo fue similar a lo publicado por Gull *et al.* (2012). Estos autores evaluaron la CMI del extracto de ajo (acuoso, etanólico y metanólico) en distintas diluciones frente a diversos patógenos, siendo los valores más bajos aquellos que estaban disueltos en extracto acuoso.

Por su parte, tanto el mirto como el calistemo inhibieron el crecimiento de las bacterias. Mabhiza *et al.* (2016) investigaron la actividad antimicrobiana del extracto de alcaloides de las hojas de *Callistemon citrinus* frente a *S. aureus* y *P. aeruginosa*. A una concentración de $1,67 \text{ mg mL}^{-1}$, los alcaloides inhibieron el crecimiento bacteriano de manera similar al antibiótico de control. La CMI del extracto de alcaloides fue de $0,0025$ y $0,21 \text{ mg mL}^{-1}$ frente a *S. aureus* y *P. aeruginosa*, respectivamente. Owlia *et al.* (2009) estudiaron las propiedades antibacterianas de aceites esenciales de mirto frente a *P. aeruginosa*, siendo su CMI de $64 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, mientras que el extracto metanólico de las hojas (Gortzi *et al.*, 2008) inhibió el crecimiento de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *C. albicans* y *L. monocytogenes*.

Aunque el mirto y el calistemo tienen capacidad inhibitoria, sus CMI fueron superiores al ajo, por lo que se descartaron para posteriores experimentos. Por otra parte, en el caso del calistemo existe bibliografía indicando su toxicidad para los animales. Bushnan *et al.*, (2014) comprobaron que, a partir de una dosis de 2 g kg^{-1} , calistemo era tóxico para los ratones. Similares efectos observaron Ali *et al.* (2011), concluyendo que el extracto metanólico de calistemo es seguro a concentraciones inferiores a $0,25 \text{ g kg}^{-1}$ y es letal a una concentración de 1 g kg^{-1} .

4.2. Capacidad de inhibición de la bioluminiscencia de *V. fischeri*

El siguiente ensayo que se realizó en este TFM fue la detección de la toxicidad de las sustancias mediante la inhibición de la bioluminiscencia de *V. fischeri*.

Durante los últimos años se han venido utilizando distintos ensayos para analizar la toxicidad de muestras recogidas del medio ambiente (Guzella *et al.*, 2004; Zani *et al.*, 2005; Villa *et al.*, 2012). Uno de los sistemas más utilizados evalúa la toxicidad aguda de las muestras del medio, basándose en la disminución de la luminiscencia natural de la bacteria de origen marino *V. fischeri*, en presencia de contaminantes. Este ensayo es muy utilizado actualmente debido a su sensibilidad, reproducibilidad, poder discriminante y a ser aplicable tanto a contaminantes orgánicos como inorgánicos. Además es un ensayo que resulta más rápido y barato que otros existentes (Onorati *et al.*, 2004). Una de las grandes ventajas que ofrece este ensayo se encuentra en que para una gran cantidad de compuestos y muestras, los datos obtenidos con Microtox® con respecto a su toxicidad son parecidos a los resultados obtenidos mediante ensayos de toxicidad estándares (Arufe *et al.*, 2004), con lo que la toxicidad en *V. fischeri* sirve para poder predecir la toxicidad en otros organismos acuáticos.

Todas las sustancias ensayadas se comportaron con un mismo patrón. Se producía una estimulación de la bioluminiscencia a dosis muy baja de las sustancias y una inhibición de la bioluminiscencia a concentraciones altas (Figura 3-7). Este efecto de estimulación a dosis bajas y de inhibición a dosis altas de un tóxico se denomina hormesis (Mattson y Cheng, 2006; Penniston y Tanumihardjo, 2006; Scapagnini *et al.*, 2006).

En el caso de la inhibición de la bioluminiscencia, nuestros resultados fueron similares a los de otros autores. Así, Kannappan *et al.* (2013) comprobaron que, a una concentración de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$, el extracto acuoso de ajo reducía la bioluminiscencia de *V. harveyi*. Similares efectos observaron Krishnan *et al.* (2012) para el clavo, cuyos componentes metanólicos redujeron de forma significativa la producción de bioluminiscencia de *E. coli*. La concentración efectiva 50 (EC50) del aceite de clavo fue inferior que la EC50 de los otros aceites, convirtiéndolo en el aceite con mayor toxicidad potencial de los cuatro.

4.3. Detección de actividad *quorum quenching* de las sustancias ensayadas

La inhibición del *quorum sensing*, proceso denominado *quorum quenching*, ha sido propuesta como una nueva terapia antimicrobiana. Su función no es eliminar al patógeno, sino evitar que sintetice factores de virulencias mediados por mecanismos de *quorum sensing* (Clatworthy *et al.*, 2007).

Excepto el aceite de citronella, todas las sustancias estudiadas tuvieron actividad *quorum quenching* (Tabla 5). Esta actividad inhibitoria pudo estar producida mediante tres mecanismos: i) inhibiendo la producción de la molécula señal, ii) bloqueando la detección de la molécula señal, o iii) disminuyendo o inhibiendo el crecimiento bacteriano (LaSarre y Federle, 2013).

Así, Mukherji y Prabhune (2014) observaron que la citronella tenía efecto anti *quorum sensing* frente a *Chromobacterium violaceum*, mostrando una inhibición de 15 mm de diámetro. Además esta zona de inhibición fue mayor (28 mm) cuando se mezcló el aceite esencial de citronella junto con el de ácido oleico.

El efecto *quorum quenching* del ajo (concentración de 400 y 4.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) pudo estar provocado por la inhibición de la producción de la molécula señal o por el bloqueo de la detección de la molécula señal, ya que el título de bacterias viables tras el ensayo fue similar al del control. Efectos similares se observaron en el estudio de Harjai *et al.* (2010), en el cual el ajo bloqueó la producción de moléculas señal de *quorum sensing* y de factores de virulencia extracelulares de *P. aeruginosa*. Estas propiedades bloqueantes del *quorum sensing* del ajo también han sido demostradas por Persson *et al.* (2005) y por Rasmussen *et al.* (2005). El extracto crudo de ajo inhibió específicamente la expresión de 92 genes regulados mediante *quorum sensing* en *P. aeruginosa*, y el total de ARNm de *lasI*, *lasR*, *rhII*, y *rhIR* (componentes clave en los sistemas de *quorum sensing* Las y Rhl en *P. aeruginosa*) fueron afectados notablemente por el tratamiento con ajo.

De distinta forma, tanto el aceite del árbol del té a 0,5 y 0,05 $\mu\text{L mL}^{-1}$, el aceite de clavo a 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$, y el aceite de aloysia a 0,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ redujeron el título de bacterias respecto al control. Es por ello que el efecto *quorum quenching* de estos aceites posiblemente lo provoque la disminución o inhibición del crecimiento celular. Husain *et al.* (2013)

estudiaron la influencia del aceite de clavo a distintas concentraciones (0,2, 0,4, 0,8 y 1,6 % v/v) sobre ciertos factores de virulencia regulados por el mecanismo *quorum sensing* en *P. aeruginosa* y *A. hydrophila*. Todas las concentraciones redujeron los niveles de LasB, proteasas totales, producción de quitinasa, piocianina y exopolisacáridos, así como la capacidad de producir biofilm de un modo dosis-dependiente.

Alvarez *et al.* (2012) establecieron que 0,21 $\mu\text{L mL}^{-1}$ era la concentración mínima de aceite esencial del árbol del té que inhibía el *quorum sensing*, y 0,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ la concentración que degradó en mayor medida la producción de violaceína en *C. violaceum*.

Por último, según Cervantes-Ceballos *et al.* (2015), el aceite de aloréa también inhibió el *quorum sensing* en *E. coli* a 2,5 y 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ tras 4 h de exposición a la sustancia. Además, a esas mismas concentraciones, la reducción se mantuvo tras 24 h de exposición.

4.4. Estabilidad de las sustancias ensayadas a distintas temperaturas y tiempos de almacenaje

Otra pregunta que nos debemos hacer es si la sustancia mantendrá estable su efecto antibacteriano a distintas temperaturas. La conservación de las propiedades que le confieren a las sustancias su poder antimicrobiano a distintas temperaturas indicará que son termoestables. Si por el contrario estas propiedades decrecen o desaparecen se considerarán termolábiles.

Un estudio de Fujisawa *et al.* (2008) describía la termoestabilidad de la alicina, el principal compuesto activo del ajo. En él concluía que la vida media de la alicina a temperatura ambiente en soluciones acuosas es de 6 días y en soluciones con etanol de 11 días. Además, a una temperatura de almacenaje de 4 °C era de alrededor de 1 año, a 15 °C de 32 días, a 23 °C de 30-40 días y a 37 °C de un día. Además, también pierde la efectividad en la inhibición con el paso de los días. Por el contrario, otras sustancias, como el aceite de clavo tienen una estabilidad mayor que el ajo, ya que su

efecto antimicrobiano no se ve afectado por la temperatura a la que es conservado, y también mantiene sus propiedades en el tiempo.

Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con los resultados de Fujisawa *et al.* (2008). El ajo, a una temperatura de almacenaje de 63 °C pierde su poder antimicrobiano a partir del primer día. A su vez, también se observó que la capacidad inhibitoria disminuía con el paso de los días, aunque la persistencia de su capacidad inhibidora era mayor cuando se almacenaba a temperaturas más bajas.

En el caso del aceite de clavo el efecto inhibitorio de la sustancia no varió a lo largo del tiempo y se observaron unos halos de inhibición mayores en el día 7 de almacenaje a 63 °C.

Por tanto la alicina se ha mostrado como un compuesto termolábil mientras que el aceite de clavo es termoestable. Esto puede deberse, entre otros a la degradación natural de la alicina. Esta mayor estabilidad del aceite de clavo juega en su contra como método de prevención de enfermedades bacterianas, ya que el impacto ecológico de los antibióticos y las sustancias persistentes dependen en gran medida de su tiempo de biodegradación, siendo las sustancias menos persistentes las mejores desde el punto de vista ambiental. Hay que aclarar que el aceite de clavo no es considerado persistente, sino relativamente poco biodegradable, como la gran mayoría de antibióticos, y que al ser natural no genera metabolitos tóxicos y no se bioacumula en animales.

4.5. Estabilidad de las sustancias adicionadas al pienso

Por último, y no menos importante, será ver si el extracto natural puede ser añadido al pienso de los peces manteniendo su efectividad bactericida, y si éste es aceptado por los peces. Es la idea de añadirlo a las dietas de los peces lo que justificó el último experimento. Esta prueba se realizó añadiendo ajo o aceite de clavo al pienso.

Se pudo observar la inhibición del crecimiento de *V. fischeri* a una concentración de 80, 40 y 20 µL g⁻¹ en el caso del aceite de clavo, y de 40 mg g⁻¹ en el caso del ajo. Estos resultados para el caso del ajo coinciden con los de Guo *et al.* (2012), en el cual el ajo

tiene un efecto bactericida al adicionarse al pienso a una concentración de 40 mg g⁻¹ de pienso, produciendo un efecto beneficioso en los peces contra *Streptococcus iniae*.

Rattanachaikunsopon y Phumkhachorn (2009) concluyeron que la estabilidad en el pienso del extracto de aceite de clavo se mantiene, y que además a una concentración de 3 % (v/v) en las dietas no había mortalidad a los 10 días de infectar a tilapias (*O. niloticus*) con *Lactococcus garvieae*.

Tradicionalmente, el aceite de clavo se ha utilizado como anestésico de los peces y se ha probado de gran utilidad en numerosas actividades en acuicultura (toma de muestras biométricas, extracción de sangre, cirugía, etc.) (Cárdenas *et al.*, 2016). Según Ross y Ross (1999) las concentraciones letales de este aceite van desde los 100 mg L⁻¹ en *Siganus lineatus*, 30 mg L⁻¹ para *Salmo gairdneri* o 20 ppm en *Oncorhynchus tshawytscha* hasta 0,013-0,27 molar en especies como *Pomacentrus amboiensis*. En nuestro trabajo, las concentraciones de aceite de clavo que han probado inhibir el crecimiento bacteriano *in vitro* son superiores a las concentraciones utilizadas normalmente para anestesiarse a los peces en la acuicultura (200-250 ppm), por lo tanto es necesario realizar un estudio para comprobar si las concentraciones de aceite de clavo que inhiben el crecimiento bacteriano *in vitro* resultan letales para los peces en un experimento *in vivo*.

Un aspecto fundamental que debemos tener en cuenta a la hora de proponer sustancias naturales en el control de enfermedades bacterianas es conocer si estas sustancias modificarán la microbiota normal que habita en los peces. Como se ha comentado previamente, el uso de antibióticos en el tratamiento de determinadas enfermedades ha modificado la microbiota natural de los peces, favoreciendo la aparición de microorganismos oportunistas y la generación de resistencia. La adición del ajo en los piensos a distintas concentraciones (1 %, 1,5 % y 2 %) ha provocado la modificación de la microbiota gastrointestinal normal en truchas (Büyükdıveci *et al.*, 2018). En su estudio, Büyükdıveci *et al.* (2018) demostraron que, tras 120 días alimentando a las truchas con esas dosis de ajo, las unidades taxonómicas operacionales más abundantes en el grupo control pertenecían a los géneros Deefgea (15.1 %) y Aeromonas (17.4 %), mientras que en los grupos alimentados con dosis del 1 y 1,5 % eran más abundantes los géneros Deefgea (20,5 % y 20,9 %) y Mycoplasma

(36,3 % y 24,3 %), respectivamente. Por último, bacterias pertenecientes al género *Aeromonas* (44,6 %) fueron las dominantes en el grupo que recibió el mayor nivel de ajo en la dieta.

A su vez, la incorporación de una determinada sustancia natural en las dietas de los peces en la acuicultura puede que no resulte de buena palatabilidad para los peces. La palatabilidad del pienso es un aspecto muy importante, ya que estos animales, en especial los más jóvenes, pueden rechazar las materias primas vegetales si se incluyen en cantidades elevadas.

4.6 Futuras líneas de investigación

Partiendo de los datos obtenidos en este estudio, se pueden proponer nuevas líneas de investigación.

Las concentraciones de aceite de clavo que han resultado efectivas para inhibir el crecimiento bacteriano son superiores a las que se utilizan normalmente como anestésico en la acuicultura. Por este motivo, se hace necesario comprobar mediante un experimento *in vivo*, dos aspectos:

- i) si los peces se comen estos piensos, mediante un ensayo de palatabilidad;
- ii) observar el comportamiento de los peces tras la ingestión, ya que el aceite de clavo actúa como anestésico a partir de los 200 ppm.

Además, se propone un segundo experimento, de mayor duración, cuyo objetivo sería comprobar si tanto del ajo como del clavo:

- i) actúan como promotores del crecimiento;
- ii) modifican parámetros inmunológicos, bioquímicos, histológicos, etc.;
- iii) provocan una alteración de la microbiota gastrointestinal;
- iv) provocan un aumento de la supervivencia de los peces y de su sistema inmunitario cuando se les inocula un patógeno.

5. CONCLUSIONES

- I. El ajo, el mirto, el calistemo y los aceites de clavo, de aloysia, de citronella y del árbol del té inhibieron, a las concentraciones ensayadas, el crecimiento de *Vibrio harveyi*, *Aeromonas hydrophila*, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* y *Vibrio fischeri*. El aceite de clavo fue el aceite con mayor capacidad de inhibir el crecimiento de los patógenos, mientras que el ajo fue el extracto soluble con mayor actividad inhibitoria.
- II. El laurel, la lavanda, el romero, la salvia, el tomillo, el orégano, *Laminaria japonica*, *Hydropuntia cornea*, *Spirulina platensis* y *Ulva sp.* no inhibieron el crecimiento de las bacterias a las concentraciones ensayadas.
- III. El ajo y los aceites de clavo, de aloysia, de citronella y del árbol del té mostraron un potencial efecto tóxico agudo sobre el metabolismo celular. El aceite del árbol del té y el aceite de clavo fueron las sustancias con menor EC50 y, por tanto, con mayor actividad tóxica *in vitro*. Por esto, se recomienda realizar estudios *in vivo* de inocuidad en los peces antes de la administración de estas sustancias.
- IV. El ajo presentó la capacidad de inhibir el *quorum sensing* bacteriano sin que ello implicase la inhibición del crecimiento celular.
- V. Los aceites de clavo, aloysia y del árbol del té fueron capaces de inhibir, a idénticas concentraciones, el *quorum sensing* y el crecimiento celular, por lo que no queda claro si se ha producido un fenómeno de *quorum quenching*, o bien la homoserina está en baja concentración debido al bajo crecimiento bacteriano.
- VI. El aceite de clavo es estable en su actividad bactericida independientemente del tiempo y temperatura de almacenamiento, mientras que el extracto de ajo pierde su capacidad inhibitoria en función de la temperatura y del tiempo de almacenamiento, siendo más estable a bajas temperaturas.
- VII. La adición del ajo y del aceite de clavo en el pienso de los peces no produjo alteración de sus propiedades antibacterianas, lo que abre la posibilidad administrar estas sustancias a los peces por vía oral.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abd El-Rhman, A.M., Khattab, Y.A.E., Shalaby, A.M.E. 2009. *Micrococcus luteus* and *Pseudomonas* species as probiotics for promoting the growth performance and health of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish & shellfish immunology*, 27(2), 175-80.
- Adel, M., Pourgholam, R., Zorriehzahra, J., Ghiasi, M. 2016. Hemato-Immunological and biochemical parameters, skin antibacterial activity, and survival in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following the diet supplemented with *Mentha piperita* against *Yersinia ruckeri*. *Fish Shellfish Immunol.*, 55, 267-273.
- Aguirre-Guzmán, G., Ruiz H.M., Asxencio, F. 2004. A review of extracellular virulence product of *Vibrio* species important in disease of cultivated shrimp. *Aquaculture Research*, 35(15), 1395-1404.
- Akinbowale, O.L., Peng, H., Barton, M.D. 2007. Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria from aquaculture sources in Australia. *J. Appl. Microbiol.*, 103(5), 2016-25.
- Alain, K. 2009. Isolation of *Aeromonas hydrophila* from naturally diseased thai pangas *Pangasius hypophthalmus*. MSc thesis, Bangladesh Agricultural University, Mymensingh, Bangladesh.
- Alderman, D.J., Hastings, T.S. 1998. Antibiotic use in aquaculture: development of antibiotic resistance-potential for consumer health risks. *Int. J. Food Sci & Technology*, 33, 139-155.
- Ali, N., Ahmed, G., Ali, S.W., Shah, I., Ghias, M., Khan, I. 2011. Acute toxicity, brine shrimp cytotoxicity and relaxant activity of fruits of *Callistemon citrinus* curtis. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 11, 99.
- Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S., Chinou, I.B. 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4168-4170.
- Allen, H.K. 2014. Antibiotic resistance gene discovery in food-producing animals. Current Opinion in *Microbiology*, 19, 25-29.
- Alvarez, M.V., Moreira, M.R., Ponce, A. 2012. Antiquorum sensing and antimicrobial activity of natural agents with potential use in food. *J. Food Safety*, 32, 379-387.
- Ankri, S., Mirelman, D. 1999. Antimicrobial properties of allicin from garlic. *Microbes and Infection*, 2, 125-129.
- Aoki, T. 1997. Resistance plasmids and the risk of transfer. In: Bernoth, E.M., Ellis, A.E., Midtlyng, P.J. *et al.*, editors. Furunculosis: Multidisciplinary Fish Disease Research. London, UK: Academic Press, 433-40.
- Arijo S. 2005. La acuicultura. *Revista El Ecologista*. 43.
- Arijo, S., Chabrilón, M., Díaz-Rosales, P., Rico, R., Martínez-Manzanares, E., Balebona, M.C., Toranzo, A.E., Moriño, M.A. 2005. Bacteria isolated from outbreaks affecting cultured sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *Bulletin of European Association of Fish Pathologists*, 25, 148-154.
- Arufe, M.I., Arellano, J., Moreno, M.J., Sarasquete, C. 2004. Toxicity of commercial herbicide containing terbutryn and triasulfuron to seabream (*Sparus aurata* L.) larvae: a comparison with the Microtox test. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 59, 209-216.

- Askarian, F., Kousha, A. Salma, W., Ringø, E. 2011. The effect of lactic acid bacteria administration on growth, digestive enzyme activity and gut microbiota in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) and beluga (*Huso huso*) fry. *Aquaculture Nutrition*, 17(5), 488-497.
- Austin, B., Pride, A.C., Rhodie, G.A. 2003. Association of a bacteriophage with virulence in *Vibrio harveyi*. *Journal of Fish Diseases*, 26(1), 55-58.
- Awad, E., Austin, B. 2010. Use of lupin, *Lupinus perennis*, mango, *Mangifera indica*, and stinging nettle, *Urtica dioica*, as feed additives to prevent *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 33(5), 413-420.
- Awad, E., Awaad, A. 2017. Role of medicinal plants on growth performance and immune status in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 67, 40-54.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446–475.
- Balbuena, E.D., Rios, V.M. 2011. Manual básico de sanidad piscícola. Ministerio de Agricultura y Ganadería de Paraguay.
- Balcázar, J.L., Rojas-Luna, T. 2007. Inhibitory activity of probiotic *Bacillus subtilis* UTM 126 against vibrio species confers protection against vibriosis in juvenile shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Current microbiology*, 55(5), 409-12.
- Bhushan, B., Sardana, S., Bansal, G. 2014. Acute and sub-acute toxicity study of *Clerodendrum inerme*, *Jasminum mesnyi* Hance and *Callistemon citrinus*. *Journal of Acute Disease*, 3(4), 324-327.
- Bisharat, N., Agmon, V., Finkelstein, R., Raz, R., Ben-Dror, G., Lerner, L., Soboh, S., Colodner, R., Cameron, D.N., Wykstra, D.L., Swerdlow, D.L., Farmer, J.J. 3rd. 1999. Clinical, epidemiological, and microbiological features of *Vibrio vulnificus* biogroup 3 causing outbreaks of wound infection and bacteraemia in Israel. Israel Vibrio Study Group. *Lancet.*, 354(9188), 1421-4.
- Blake, P.A., Merson, M.H., Weaver, R.E., Hollis, D.G., Heublein, P.C. 1979. Disease caused by a marine Vibrio. *Clinical characteristics and epidemiology.*, 300(1), 1-5.
- Blanco, M.M., Liébana, P., Gibello, A., Alcalá, C., Fernández-Garayzabal, J.F., Domínguez, L. 2004. Principales patologías bacterianas en la piscicultura española. *RedVet. Veterinaria.org*. ISBN: 1695-7504.
- Borja, Á. 2002. Los impactos ambientales de la acuicultura y la sostenibilidad de esta actividad. *Boletín Instituto Español de Oceanografía.*, 18(1-4), 41-49.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94(3), 223– 253.
- Burt, S., Reinders, R.D. 2003. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*, 36(3), 162– 167.
- Buschmann, A.H. 2001. Impacto ambiental de la acuicultura: El Estado de la investigación en Chile y el mundo. *Terram Publicaciones*.
- Büyükdıveci, M.E., Balcázar, J.L., Demirkale, I., Dikel, S. 2018. Effects of garlic-supplemented diet on growth performance and intestinal microbiota of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 486, 170-174.
- Cárdenas, C., Toni, C., Martos-Sitcha, J.A., Cárdenas, S., de las Heras, V., Baldisserotto, B. Heinzmann, B.M, Vazquez, R., Mancera, J.M. 2016. Effects of clove oil, essential oil of *Lippia alba* and 2-phe anaesthesia on juvenile meagre, *Argyrosomus regius* (Asso, 1801). *J. Appl. Ichthyol.*, 1-8.

- Carson, C.F., Mee, B.J., Riley, T.V. 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(6), 1914–1920.
- Celikel, N., Kavas, G. 2008. Antimicrobial properties of some essential oils against some pathogenic microorganisms. *Czech J. Food Sci.*, 26(3), 174–181.
- Cervantes-Ceballos, L., Caballero-Gallardo, K., Olivero-Verbel, J. 2015. Repellent and anti-quorum sensing activity of six aromatic plants occurring in Colombia. *Natural Product Communications*, 10(10), 1753-1757.
- Chiu, H.C., Cheng, C.H., Gua, W.R., Guu, Y.K., Cheng, W. 2010. Dietary administration of the probiotic, *Saccharomyces cerevisiae* P13, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish & Shellfish Immunology*, 29(6), 1053–1059.
- Citarasu, T., Sekar, R.R., Babu, M.M., Marian, M.P. 2002. Developing *Artemia* enriched herbal diet for producing quality larvae in *Penaeus monodon*. *Asian Fisheries Science*, 15, 21-32.
- Clatworthy, A.E., Pierson, E., Hung, D.T. 2007. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nature Chemical Biology*, 3(9), 541-8.
- Dabrowski, K., Lee, K.J., Guz, L., Verlhac, V., Gabaudan, J. 2004. Effects of dietary ascorbic acid on oxygen stress (hypoxia or hyperoxia), growth and tissue vitamin concentrations in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 233, 383-92.
- De Rapper, S., Kamatou, G., Viljoen, A., van Vuuren, S. 2013. The *in vitro* antimicrobial activity of *Lavandula angustifolia* essential oil in combination with other aromatic therapeutic oils. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: eCAM*, 2013, 852049.
- Defoirdt, T., Sorgeloos, P., Bossier, P. (2011). Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Current Opinion in Microbiology*, 14(3), 251-8.
- Divyagnaneswari, M., Christyapita, D., Michael, R.D. 2007. Enhancement of nonspecific immunity and disease resistance in *Oreochromis mossambicus* by *Solanum trilobatum* leaf fractions. *Fish. Shellfish Immunol.* 23(2), 249-259.
- Dotta, G.M., Pedreira, J.L., Jatobá, A., Burgos, R.E., Pilati, C., Laterça, M. 2011. Acute inflammatory response in Nile tilapia fed probiotic *Lactobacillus plantarum* in the diet. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, 33(3), 239-246.
- Erdal, J.I., Reitan, L.J. 1992. Immune response and protective immunity after vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) against furunculosis. *Fish Shellfish Immunol*, 2(2), 99–108.
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 2016. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. *El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2016*. 224 pp. Roma.
- Fernández-Calienes, A., Mendiola, J., Monzote, L., García, M., Sariego, I., Acuña, D., Scull, R., Gutiérrez, Y. 2009. Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparasitaria utilizando larvas de *Artemia salina* L. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 61(3), 254-258.
- Fjellheim, A.J., Playfoot, K.J., Skjermo, J., Vadstein, O. 2007. *Vibrionaceae* dominates the microflora antagonistic towards *Listonella anguillarum* in the intestine of cultured Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Aquaculture*, 269(1-4), 98-106.

- Friedman, M., Henika, P., Mandrell, R. 2002. Bactericidal Activities of Plant Essential Oils and Some of Their Isolated Constituents against *Campylobacter jejuni*, 18 *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*, 65(10), 1545-1560.
- Fujisawa, H., Suma, K., Origuchi, K., Seki, T., Ariga, T. 2008. Thermostability of allicin determined by chemical and biological assays. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72(11), 2877-2883.
- Fuqua, C., Winans, S.C., Greenberg, E.P. 1996. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.*, 50, 591-624.
- Galindo-Villegas, J., Hosokawa, H. 2004. Immunostimulants: towards temporary prevention of diseases in marine fish. *Advances en Nutrición. Acuicola VII Memorias del VII Simp. Int. Nutr. Acuicola*, 16-19.
- Gill, A., Holley, R. 2004. Mechanisms of Bactericidal Action of Cinnamaldehyde against *Listeria monocytogenes* and of Eugenol against *L. monocytogenes* and *Lactobacillus sakei*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(10), 5750-5755.
- Gortzi, O., Lalas, S., Chinou, I., Tsaknis, J. 2008. Reevaluation of bioactivity and antioxidant activity of *Myrtus communis* extract before and after encapsulation in liposomes. *Eur Food Res Technol.*, 226, 583-590.
- Gull, I., Saeed, M., Shaukat, H., Aslam, S. M., Samra, Z. Q., Athar, A. M. 2012. Inhibitory effect of *Allium sativum* and *Zingiber officinale* extracts on clinically important drug resistant pathogenic bacteria. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 11, 8.
- Guo, J.J., Kuo, C.M., Chuang, Y.C., Hong, J.W., Chou, R.L., Chen, T.I. 2012. The effects of garlic-supplemented diets on antibacterial activity against *Streptococcus iniae* and on growth in orange-spotted grouper, *Epinephelus coioides*. *Aquaculture*. 364-365, 33-38.
- Gupta, C., Garg, A.P., Uniyal, R.C., Gupta, S. (2009). Comparison of antimicrobial activities of clove oil and its extract on some food borne microbes. *The Internet Journal of Microbiology*, 7 (1).
- Guzella, L., Monarca, S., Zani, C., Feretti, D., Zerbini, I., Buschini, A., Poli P., Rossi, C., Richardson, S.D. 2004. *In vitro* potential genotoxic effects of surface drinking water treated with chlorine and alternative disinfectants. *Mutation Research*. 564(2), 179-193.
- Hammer, K.A., Carson, C.F., Riley, T.V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*. 86(6), 985-990.
- Harjai, K., Kumar, R., Singh, S. 2010. Garlic blocks *quorum sensing* and attenuates the virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Immunol Med Microbiol.*, 58(2), 161-168.
- Heuer, O.E., Grave, K., Collignon, P., Karunasagar, I., Angulo, F.J. 2009. Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Clinical Infect Dis.*, 49(8), 1248-53.
- Husain, F.M., Ahmad, I., Asif, M., Tahseen, Q. 2013. Influence of clove oil on certain quorum-sensing-regulated functions and biofilm of *Pseudomonas aeruginosa* and *Aeromonas hydrophila*. *J. Biosci.* 38(5), 835-44.
- IARC (Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans). 2006. Formaldehyde, 2-butoxyethanol and 1-tertbutoxypropan-2-ol. Lyon (FR:

- International Agency for Research on Cancer; 2006. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. 88, 478 pp.
- Inouye, S. 1994. NAD(P)H-flavin oxidoreductase from the bioluminescent bacterium, *Vibrio fischeri* ATCC 7744, is a flavoprotein. *FEBS Letters*, 347(2-3), 163-168.
- Joshi, J., Srisala, J., Truong, V.H., Chen, I-T., Nuangsaeng, B., Suthienkul, O., Lo, C.F., Flegel, T.W., Sritunyalucksana, K., Thitamadee, S. 2014. Variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from a single Thai shrimp farm experiencing an outbreak of acute hepatopancreatic necrosis disease (AHPND). *Aquaculture*, 428–429, 297-302.
- Kailasapathy, K., Chin, J. 2000. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* *Immunology and Cell Biology*, 78(1), 80-88.
- Kannappan, S., Sivakumar, K., Patil, P.K. 2013. Effect of garlic extract on the luciferase, bioluminescence, virulence factors produced by *Vibrio harveyi* with a challenge during *Penaeus monodon* larviculture. *Afr. J. Microbiol. Res.*, 7(18), 1766-1779.
- Karuppiyah, P., Rajaram, S. 2012. Antibacterial effect of *Allium sativum* cloves and *Zingiber officinale* rhizomes against multiple-drug resistant clinical pathogens. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2(8), 597-601.
- Koch, H.P., Lawson, L.D. 1996. Garlic: the Science and Therapeutic Application of *Allium sativum* L. and Related Species, second ed. *Williams and Wilkins*, Baltimore.
- Krishnan, T., Yin, W.-F., Chan, K.G. 2012. Inhibition of quorum sensing-controlled virulence factor production in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 by ayurveda spice clove (*Syzygium Aromaticum*) bud extract. *Sensors* (Basel, Switzerland), 12(4), 4016–4030.
- Kruse, H., Sørum, H. 1994. Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origin in natural micro-environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(11), 4015–21.
- Kruse, H., Sørum, H., Tenover, F.C., Olsvik, Ø. 1995. A transferable multiple drug resistance plasmid from *Vibrio cholerae* O1. *Microbial Drug Resistance*, 1(3), 203-210.
- LaSarre, B., Federle, M.J. 2013. Exploiting quorum sensing to confuse bacterial pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 77(1), 73-111.
- Le, T.S., Munekage, Y., Kato, S. (2005). Antibiotic resistance in bacteria from shrimp farming in mangrove areas. *Science of the Total Environmental*, 349(1-3), 95–105.
- Lilley, J. H., Phillips, M. J., Tonguthai, K. 1992. A review of epizootic ulcerative syndrome (EUS) in Asia. Aquatic Animal Health Research Institute and Network of Aquaculture Centres in Asia-Pacific, Bangkok.
- Lin, J-W., Chao, Y-F., Weng, S-F. 1993. Nucleotide sequence of the luxC gene encoding fatty acid reductase of the lux operon from *Photobacterium leiognathi*. *Biochemical and biophysical research communications*. 191(1), 314-318.
- Mabhiza, D., Chitemerere, T., Mukanganyama, S. 2016. Antibacterial properties of alkaloid extracts from *Callistemon citrinus* and *Vernonia adoensis* against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Medicinal Chemistry*, 7 pp.
- Mattson, M.P., Cheng, A. 2006. Neurohormetic phytochemicals: Low-dose toxins that induce adaptive neuronal stress responses. *Trends Neurosci.*, 29(11), 632-9.

- Mohamad, S., Abasali, H. 2010. Effect of plant extracts supplemented diets on immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila* in common carp (*Cyprinus carpio*), *Res. J. Animal Sci.*, 4(1), 26-34.
- Mukherji, R., Prabhune, A. 2014. Novel glycolipids synthesized using plant essential oils and their application in *quorum sensing* inhibition and as antibiofilm agents. *The Scientific World Journal*, 7 pp.
- Nakajima, T., Suzuki, M., Harada, K., Inoue, M., Mitsunashi, S. 1983. Transmission of R plasmids in *Vibrio anguillarum* to *Vibrio cholera*. *Microbiology and Immunology*. 27, 195-198.
- Navarrete, P., Mardones, P., Opazo, R., Espejo, R.T., Romero, J. 2008. Oxytetracycline treatment reduces bacterial diversity of intestinal microbiota of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Aquatic Animal Health* 20, 177-183.
- Núñez, M., Pozo, M., Valladares, J. (2001). Concentración inhibitoria mínima de tres extractos de plantas medicinales sobre bacterias del género *Aeromonas*, causantes de enfermedades en peces. *Revista AquaTIC*, Nº 14.
- Nya, E.J., Austin, B. 2009. Use of garlic, *Allium sativum*, to control *Aeromonas hydrophila* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases* 32(11), 963–970.
- Onorati, F., Mecozzi, M. 2004. Effects of two diluents in the Microtox toxicity bioassay with marine sediments. *Chemosphere*, 54(5), 679-687.
- Owlia, P., Sadari, H., Rasooli, I., Sefidkon, F. 2009. Antimicrobial characteristics of some herbal oils on *Pseudomonas aeruginosa* with special reference to their chemical compositions. *Iran J Pharm Res.*, 8(2), 107-114.
- Papenfort, K., Bassler, B.L. 2016. *Quorum sensing* signal-response system in Gram-negative bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.*, 14(9), 576-88.
- Penniston, K.L, Tanumihardjo, S.A. 2006. The acute and chronic toxic effects of vitamin A. *Am J Clin Nutr.* 83(2), 191-201.
- Persson, T., Hansen, T.H., Rasmussen, T.B., Skindersø, M.E., Givskov, M., Nielsen, J. 2005. Rational design and synthesis of new *quorum-sensing* inhibitors derived from acylated homoserine lactones and natural products from garlic. *Org Biomol Chem.*, 3(2), 253-262.
- Ransangan, J., Mustafa, S. 2009. Identification of *Vibrio harveyi* isolated from diseased Asian seabass *Lates calcarifer* by use of 16S ribosomal DNA sequencing. *J Aquat Anim Health*, 21(3), 150-5.
- Rasmussen, T.B., Bjarnsholt, T., Skindersø, M.E., Hentzer, M., Kristoffersen, P. Kôte, M., Nielsen, J., Eberl, L., Givskov, M. 2005. Screening for *quorum-sensing* inhibitors (QSI) by use of a novel genetic system, the QSI selector. *J Bacteriol*, 187, 1799-1814.
- Rattanachaiakunsopon, P., Phumkhachorn, P. 2009. Protective effect of clove oil-supplemented fish diets on experimental *Lactococcus garvieae* infection in Tilapia. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73(9), 2085-2089.
- Reyes, D., Fernández Da Silva, R. 2014. Actividad antimicrobiana *in vitro* del extracto foliar de zabila (*Aloe vera* L.) en microorganismos de interés clínico. *Salus*, 18(3), 27-32.
- Robertsen, B. 1999. Modulation of the non-specific defense of fish by structurally conserved microbial polymers. *Fish and Shellfish Immunology*. 9, 269-290.

- Rodríguez, M., Rodríguez, D.G., Monroy, Y., Mata, J.A. 2001. Manual de enfermedades de peces. *Boletín del Programa Nacional de Sanidad Acuicola y la Red de Diagnóstico*, 3(15), 1-14.
- Romalde, J.L. 2002. *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: an integrated view of a bacterial fish pathogen. *International Microbiology*, 5(1), 3–9.
- Romero, J., Feijoo, C.G., Navarrete, P. 2012. Antibiotics in aquaculture – use, abuse and alternatives. In book: Health and environment in aquaculture, Publisher: InTech.
- Ross, L.G., Ross, B. 1999. *Anesthetic and sedative techniques for aquatic animals*. Institute of Aquaculture, Univ of Stirling. 58, 145-155.
- Runyoro, D., Ngassapa, O., Vagionas, K., Aligiannis, N., Graikou, K., Chinou, I. 2010. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of four *Ocimum* species growing in Tanzania. *Food Chemistry*, 119(1), 311-6.
- Sakai, M. 1999. Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172(1–2), 63-92.
- Sandaa, R.A., Torsvik, V.L., Grokoyr, J. 1992. Transferable drug resistance in bacteria from fish-fm sediments. *Canadian Journal of Microbiology*; 38(10), 1061-1065.
- Scapagnini, G., Colombrita, C., Amadio, M., D'Agata, V., Arcelli, E., Sapienza, M., Quattrone, A., Calabrese, V. 2006. Curcumin activates defensive genes and protects neurons against oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. 8(3-4), 395-403.
- Sivaram, V., Babu, M.M., Citarasu, T., Immanuel, G., Murugadass, S., Marian, M.P. (2004). Growth and immune response of juvenile greasy groupers (*Epinephelus tauvina*) fed with herbal antibacterial active principle supplemented diets against *Vibrio harveyi* infections. *Aquaculture*, 237(1-4), 9-20.
- Sommerset, I., Krossøy, B., Biering, E., Frost, P. 2005 Vaccines for fish aquaculture. *Expert Review of Vaccines*, 4(1), 89–101.
- Stenholm, A.R., Dalsgaard, I., Middelboe, M. 2008. Isolation and characterization of bacteriophages infecting the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Appl Environ Microbiol*, 74(13), 4070-4078.
- Talpur, A.D., Ikhwanuddin, M., 2012. Dietary effects of garlic (*Allium sativum*) on haemato-immunological parameters, survival, growth, and disease resistance against *Vibrio harveyi* infection in Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch). *Aquaculture*, 364–365, 6–12.
- Toranzo, A.E., Dopazo, C.P., Romalde, J.L., Santos, Y., Barja, J.L. 1997. Estado actual de la patología bacteriana y vírica en la piscicultura española. *Revista AquaTIC*, nº 1.
- Tsai, P.-J., Tsai, T.-H., Ho, S.-C. 2007. *In vitro* inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of *Streptococcus sobrinus*. *Food Chemistry*, 105, 311–316.
- Villa, S., Migliorati, S., Monti, G.S., Marco Vighi. M. 2012. Toxicity on the luminescent bacterium *Vibrio fischeri* (Beijerinck). II: Response to complex mixtures of heterogeneous chemicals at low levels of individual components. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 86, 93-100.
- Waters, C.M., Bassler, B.L. 2005. *Quorum sensing*: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu Rev Cell Dev Biol.*, 21, 319-46.
- Weinstein, M. R., Litt, M., Kertesz, D.A., Wyper, P., Rose, D., Coulter, M., McGeer, A., Facklam, R., Ostach, C., Willey, B.M, Borczyk, A., Low, D.E. 1997. Invasive infections due to a fish pathogen, *Streptococcus iniae*. S. *iniae* Study Group. *N Engl J Med*. 337(9), 589-94.

- Weston, D.P. 1996. Environmental considerations in the use of antibacterial drugs in aquaculture. In: Baird, D., Beveridge, M.V.M., Kelly, L.A. and Muir, J. F. (Ed.) *Aquaculture and Water Resource Management*. Blackwell, Oxford, 140– 165.
- Wu, Y.R., Gong, Q.F., Fang, H., Liang, W.W., Chen, M., He, R.J. 2013. Effect of *Sophora flavescens* on non-specific immune response of tilapia (GIFT *Oreochromis niloticus*) and disease resistance against *Streptococcus agalactiae*. *Fish Shellfish Immunol.*, 34(1), 220-227.
- Yin, G., Ardó, L., Thompson, K., Adams, A., Jeney, Z., Jeney, G. 2009. Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Ganoderma lucidum*) enhance immune response of carp, *Cyprinus carpio*, and protection against *Aeromonas hydrophila*, *Fish Shellfish Immunol.*, 26(1), 140-145.
- Zani, C., Feretti, D., Buschini, A., Poli, P., Rossi, C., Guzzella, L., Dicaterino, F., Monarcha, S. 2005. Toxicity and genotoxicity of surface water before and after various potabilization steps. *Mutation Research*. 587, 26-37.
- Zorrilla, I., Chabrilón, M., Arijo, S., Díaz-Rosales, P., Martínez-Manzanares, E., Balebona, M.C., Moriñigo, M.A. 2003. Bacteria recovered from diseased cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) in southwestern Spain. *Aquaculture*. 218, 11-20.

ANEXOS

Anexo I. Resultados de la inhibición del **aceite de aloysia**, de **clavo**, de **citronella** y de **árbol del té** sobre *V. harveyi* por el **método de pocillos**. Los números representan el diámetro medio de los halos de inhibición (expresados en cm).

Dilución	Concentración ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	Ac. Aloysia (<i>Aloysia citriodora</i>)	Ac. Clavo (<i>Syzygium aromaticum</i>)	Ac. Citronella (<i>Cymbopogon citratius</i>)	Ac. Árbol del té (<i>Melaleuca alternifolia</i>)
N	500	1,9	2,7	1,9	2
1:2	250	1,8	2,2	1,7	1,8
1:4	125	1,5	2	1,5	1,7
1:8	62,5	1,2	1,8	1,4	1,4
1:16	31,25	1,1	1,6	1,1	1,1
1:32	15,63	-	1,5	-	-
1:64	7,81	-	1,3	-	-

Anexo II. Resultados de la inhibición del **ajo**, del **mirto** y de **calistemo** sobre *V. harveyi* por el **método de pocillos**. Los números representan el diámetro medio de los halos de inhibición (expresados en cm).

Dilución	Concentración (mg mL^{-1})	Ajo (<i>Allium sativum</i>)	Mirto (<i>Myrtus communis</i>)	Calistemo (<i>Callistemon citrinus</i>)
N	200	3	1,9	1,2
1:2	100	2,7	1,7	1
1:4	50	2,4	1,5	1
1:8	25	1,7	1,3	-
1:16	12,5	1,6	1,1	-
1:32	6,25	1,4	-	-
1:64	3,125	1,2	-	-

Anexo III. Resultados de la inhibición del **aceite de aloysia**, de **clavo**, de **citronella** y de **árbol del té** sobre *V. harveyi* por el método de **discos de papel**. Los números representan el diámetro medio de los halos de inhibición (expresados en cm).

Dilución	Concentración ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	Ac. Aloysia (<i>Aloysia citriodora</i>)	Ac. Clavo (<i>Syzygium aromaticum</i>)	Ac. Citronella (<i>Cymbopogon citratus</i>)	Ac. Árbol del té (<i>Melaleuca alternifolia</i>)
N	500	2	2,5	1,1	1,5
1:2	250	1,8	2,3	1,1	1,3
1:4	125	1,6	2,2	1	1,1
1:8	62,5	1,4	2	-	-
1:16	31,25	1	1,8	-	-
1:32	15,63	1	1,1	-	-
1:64	7,81	-	-	-	-

Anexo IV. Resultados de la inhibición del **ajo**, del **mirto** y de **calistemo** sobre *V. harveyi* por el **método de discos de papel**. Los números representan el diámetro medio de los halos de inhibición (expresados en cm).

Dilución	Concentración (mg mL^{-1})	Ajo (<i>Allium sativum</i>)	Mirto (<i>Myrtus communis</i>)	Calistemo (<i>Callistemon citrinus</i>)
N	200	1,2	1,8	-
1:2	100	1	1,3	-
1:4	50	-	-	-
1:8	25	-	-	-
1:16	12,5	-	-	-
1:32	6,25	-	-	-
1:64	3,125			

Anexo V. Resultados de la inhibición del **aceite de aloysia**, de **clavo**, de **citronella** y de **árbol del té** sobre *A. hydrophila* por el **método de pocillos**. Los números representan el diámetro medio de los halos de inhibición (expresados en cm).

Dilución	Concentración ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	Ac. Aloysia (<i>Aloysia citriodora</i>)	Ac. Clavo (<i>Syzygium aromaticum</i>)	Ac. Citronella (<i>Cymbopogon citratius</i>)	Ac. Árbol del té (<i>Melaleuca alternifolia</i>)
N	500	3	2,2	3	2,1
1:2	250	2,8	1,5	2,6	2
1:4	125	1,8	1,3	2,3	1,2
1:8	62,5	1,5	1,2	1,9	-
1:16	31,25	1,2	1	-	-
1:32	15,63	-	-	-	-
1:64	7,81	-	-	-	-

Anexo VI. Resultados de la inhibición del **ajo**, del **mirto** y de **calistemo** sobre *A. hydrophila* por el **método de pocillos**. Los números representan el diámetro medio de los halos de inhibición (expresados en cm).

Dilución	Concentración (mg mL^{-1})	Ajo (<i>Allium sativum</i>)	Mirto (<i>Myrtus communis</i>)	Calistemo (<i>Callistemon citrinus</i>)
N	200	3,4	1,7	1,2
1:2	100	3,1	1,5	1
1:4	50	2,9	1,4	1
1:8	25	2,7	1,2	-
1:16	12,5	2,1	1	-
1:32	6,25	1,5	-	-
1:64	3,125	-	-	-

Anexo VII. Resultados de la inhibición del **aceite de aloysia**, de **clavo**, de **citronella** y de **árbol del té** sobre *A. hydrophila* por el método de **discos de papel**. Los números representan el diámetro medio de los halos de inhibición (expresados en cm).

Dilución	Concentración ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	Ac. Aloysia (<i>Aloysia citriodora</i>)	Ac. Clavo (<i>Syzygium aromaticum</i>)	Ac. Citronella (<i>Cymbopogon citratus</i>)	Ac. Árbol del té (<i>Melaleuca alternifolia</i>)
N	500	2,8	2,5	2	3,1
1:2	250	2,5	2,4	1,7	1,7
1:4	125	1,7	1,6	1,1	1
1:8	62,5	1,4	1,3	1	-
1:16	31,25	1,1	1,2	1	-
1:32	15,63	1	1	-	-
1:64	7,81	-	-	-	-

Anexo VIII. Resultados de la inhibición del **ajo**, del **mirto** y de **calistemo** sobre *A. hydrophila* por el **método de discos de papel**. Los números representan el diámetro medio de los halos de inhibición (expresados en cm).

Dilución	Concentración (mg mL^{-1})	Ajo (<i>Allium sativum</i>)	Mirto (<i>Myrtus communis</i>)	Calistemo (<i>Callistemon citrinus</i>)
N	200	1,8	-	-
1:2	100	1,3	-	-
1:4	50	-	-	-
1:8	25	-	-	-
1:16	12,5	-	-	-
1:32	6,25	-	-	-
1:64	3,125	-	-	-

Anexo IX. Resultados de la inhibición del **aceite de aloysia**, de **clavo**, de **citronella** y de **árbol del té** sobre *P. damsela* subsp. *piscicida* por el **método de pocillos**. Los números representan el diámetro medio de los halos de inhibición (expresados en cm).

Dilución	Concentración ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	Ac. Aloysia (<i>Aloysia citriodora</i>)	Ac. Clavo (<i>Syzygium aromaticum</i>)	Ac. Citronella (<i>Cymbopogon citrat</i>)	Ac. Árbol del té (<i>Melaleuca alternifolia</i>)
N	500	2,4	2,6	1,9	2
1:2	250	1,8	2,4	1,7	1,8
1:4	125	1,6	2,2	1,6	1,5
1:8	62,5	1,3	2	1,3	1,3
1:16	31,25	1,1	1,6	1,2	1,1
1:32	15,63	-	1,5	-	-
1:64	7,81	-	1,3	-	-

Anexo X. Resultados de la inhibición del **ajo**, del **mirto** y de **calistemo** sobre *P. damsela* subsp. *piscicida* por el **método de pocillos**. Los números representan el diámetro medio de los halos de inhibición (expresados en cm).

Dilución	Concentración (mg mL^{-1})	Ajo (<i>Allium sativum</i>)	Mirto (<i>Myrtus communis</i>)	Calistemo (<i>Callistemon citrinus</i>)
N	200	3	1,9	1,8
1:2	100	2,8	1,8	1,4
1:4	50	2,3	1,5	1,3
1:8	25	2,1	1,2	1
1:16	12,5	1,6	-	-
1:32	6,25	1,3	-	-
1:64	3,125	-	-	-

Anexo XI. Resultados de la inhibición del **aceite de aloysia**, de **clavo**, de **citronella** y de **árbol del té** sobre *P. damselae subsp. piscicida* por el método de **discos de papel**. Los números representan el diámetro medio de los halos de inhibición (expresados en cm).

Dilución	Concentración ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	Ac. Aloysia (<i>Aloysia citriodora</i>)	Ac. Clavo (<i>Syzygium aromaticum</i>)	Ac. Citronella (<i>Cymbopogon citratus</i>)	Ac. Árbol del té (<i>Melaleuca alternifolia</i>)
N	500	2,4	2,5	1,7	1,9
1:2	250	2,3	2,3	1,5	1,7
1:4	125	1,8	1,9	1,3	1,5
1:8	62,5	1,7	1,6	1,2	1,4
1:16	31,25	1,4	1,5	1	1,2
1:32	15,63	1,1	1,2	-	-
1:64	7,81	-	-	-	-

Anexo XII. Resultados de la inhibición del **ajo**, del **mirto** y de **calistemo** sobre *P. damselae subsp. piscicida* por el método de **discos de papel**. Los números representan el diámetro medio de los halos de inhibición (expresados en cm).

Dilución	Concentración (mg mL^{-1})	Ajo (<i>Allium sativum</i>)	Mirto (<i>Myrtus communis</i>)	Calistemo (<i>Callistemon citrinus</i>)
N	200	1,5	-	-
1:2	100	1,3	-	-
1:4	50	-	-	-
1:8	25	-	-	-
1:16	12,5	-	-	-
1:32	6,25	-	-	-
1:64	3,125	-	-	-

Anexo XIII. Resultados de la inhibición del **aceite de aloysia**, de **clavo**, de **citronella** y de **árbol del té** sobre **V. fischeri** por el **método de pocillos**. Los números representan el diámetro medio de los halos de inhibición (expresados en cm).

Dilución	Concentración ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	Ac. Aloysia (<i>Aloysia citriodora</i>)	Ac. Clavo (<i>Syzygium aromaticum</i>)	Ac. Citronella (<i>Cymbopogon citratrus</i>)	Ac. Árbol del té (<i>Melaleuca alternifolia</i>)
N	500	3,4	2,5	2,7	3,2
1:2	250	3,2	2,4	2,1	2,7
1:4	125	2,4	2,2	2	2
1:8	62,5	2	1,9	1,5	1,7
1:16	31,25	1,3	1,7	1,2	1,3
1:32	15,63	-	1,4	-	-
1:64	7,81	-	1,2	-	-

Anexo XIV. Resultados de la inhibición del **ajo**, del **mirto** y de **calistemo** sobre **V. fischeri** por el **método de pocillos**. Los números representan el diámetro medio de los halos de inhibición (expresados en cm). NT: No Testado.

Dilución	Concentración (mg mL^{-1})	Ajo (<i>Allium sativum</i>)	Mirto (<i>Myrtus communis</i>)	Calistemo (<i>Callistemon citrinus</i>)
N	200	3,6	NT	NT
1:2	100	3,3	NT	NT
1:4	50	2,7	NT	NT
1:8	25	2	NT	NT
1:16	12,5	1,7	NT	NT
1:32	6,25	1,5	NT	NT
1:64	3,125	1,3	NT	NT

Anexo XV. Valores de luminiscencia, porcentaje de extinción, porcentaje de extinción media y desviación típica para las distintas concentraciones de **aceite de aloysia** (*Aloysia citriodora*).

Muestra ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	Réplicas	Luminiscencia a los 15 minutos	Extinción (%)	Extinción media (%)	Desviación típica
Control	Réplica 1	142	-	0,0	0,0
	Réplica 2	118	-		
	Réplica 3	113	-		
0,0006	Réplica 1	-	-	-35,8	5,9
	Réplica 2	176	-49,6		
	Réplica 3	179	-57,9		
0,0012	Réplica 1	159	-12,0	-41,1	29,6
	Réplica 2	165	-40,2		
	Réplica 3	194	-71,2		
0,0024	Réplica 1	168	-18,3	-51,4	28,7
	Réplica 2	199	-69,1		
	Réplica 3	189	-66,8		
0,0049	Réplica 1	150	-5,6	-28,8	20,5
	Réplica 2	160	-36,0		
	Réplica 3	164	-44,7		
0,0098	Réplica 1	143	-0,7	-22,2	18,8
	Réplica 2	153	-30,0		
	Réplica 3	154	-35,9		
0,0195	Réplica 1	133	6,3	-14,1	18,5
	Réplica 2	140	-19,0		
	Réplica 3	147	-29,7		
0,0391	Réplica 1	119	16,2	4,9	10,2
	Réplica 2	122	-3,7		
	Réplica 3	111	2,1		
0,0781	Réplica 1	101	28,9	22,3	6,8
	Réplica 2	91	22,7		
	Réplica 3	96	15,3		
0,1563	Réplica 1	40	71,8	62,6	8,9
	Réplica 2	45	61,8		
	Réplica 3	52	54,1		
0,3125	Réplica 1	30	78,9	75,6	3,1
	Réplica 2	29	75,4		
	Réplica 3	31	72,6		
0,6250	Réplica 1	10	93,0	87,8	5,3
	Réplica 2	14	88,1		
	Réplica 3	20	82,4		
1,2500	Réplica 1	0	100,0	96,3	3,4
	Réplica 2	8	93,2		
	Réplica 3	5	95,6		
2,5000	Réplica 1	0	100,0	100,0	0,0
	Réplica 2	0	100,00		
	Réplica 3	0	100,00		

Anexo XVI. Valores de luminiscencia, porcentaje de extinción, porcentaje de extinción media y desviación típica para las distintas concentraciones de **aceite de clavo** (*Syzygium aromaticum*).

Muestra ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	Réplicas	Luminiscencia a los 15 minutos	Extinción (%)	Extinción media (%)	Desviación típica
Control	Réplica 1	120	-		
	Réplica 2	123	-	0,0	0,0
	Réplica 3	103	-		
0,0006	Réplica 1	141	-17,2		
	Réplica 2	-	-	-	-
	Réplica 3	-	-		
0,0012	Réplica 1	123	-2,2		
	Réplica 2	189	-54,1	-39,0	32,0
	Réplica 3	166	-60,6		
0,0024	Réplica 1	119	1,1		
	Réplica 2	180	-46,7	-38,0	35,6
	Réplica 3	174	-68,4		
0,0049	Réplica 1	101	16,1		
	Réplica 2	179	-45,9	-18,2	31,5
	Réplica 3	129	-24,8		
0,0098	Réplica 1	99	17,7		
	Réplica 2	132	-7,6	-3,3	19,2
	Réplica 3	124	-20,0		
0,0195	Réplica 1	85	29,4		
	Réplica 2	119	3,0	11,2	15,7
	Réplica 3	102	1,3		
0,0391	Réplica 1	59	51,0		
	Réplica 2	81	34,0	39,7	9,8
	Réplica 3	68	34,2		
0,0781	Réplica 1	30	75,1		
	Réplica 2	39	68,2	69,5	5,1
	Réplica 3	36	65,2		
0,1563	Réplica 1	10	91,7		
	Réplica 2	31	74,7	77,8	12,6
	Réplica 3	34	67,1		
0,3125	Réplica 1	0	100,0		
	Réplica 2	15	87,8	92,1	6,9
	Réplica 3	12	88,4		
0,6250	Réplica 1	0	100,0		
	Réplica 2	0	100,0	100,0	0,0
	Réplica 3	0	100,0		
1,2500	Réplica 1	0	100,0		
	Réplica 2	0	100,00	100,0	0,0
	Réplica 3	0	100,00		
2,5000	Réplica 1	0	100,00		
	Réplica 2	0	100,00	100,00	0,00
	Réplica 3	0	100,00		

Anexo XVII. Valores de luminiscencia, porcentaje de extinción, porcentaje de extinción media y desviación típica para las distintas concentraciones de **ajo (*Allium sativum*)**.

Muestra ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Réplicas	Luminiscencia a los 15 minutos	Extinción (%)	Extinción media (%)	Desviación típica
control	Réplica 1	150	-	0,0	0,0
	Réplica 2	132	-		
	Réplica 3	140	-		
400,0	Réplica 1	-	-	-	-
	Réplica 2	-	-		
	Réplica 3	-	-		
500,0	Réplica 1	-	-	-	-
	Réplica 2	-	-		
	Réplica 3	-	-		
571,5	Réplica 1	-	-	-	-
	Réplica 2	-	-		
	Réplica 3	-	-		
666, 7	Réplica 1	-	-	-	-
	Réplica 2	-	-		
	Réplica 3	-	-		
800,0	Réplica 1	-	-	-	-
	Réplica 2	-	-		
	Réplica 3	-	-		
1.000,0	Réplica 1	154	-2,7	-7,7	8,8
	Réplica 2	156	-17,9		
	Réplica 3	144	-2,6		
1.142,9	Réplica 1	150	0,0	6,4	9,0
	Réplica 2	129	2,5		
	Réplica 3	117	16,6		
1.333,3	Réplica 1	141	6,0	13,6	15,0
	Réplica 2	127	4,0		
	Réplica 3	97	30,9		
1.600,0	Réplica 1	134	10,7	22,6	14,0
	Réplica 2	107	19,1		
	Réplica 3	87	38,0		
2.000,0	Réplica 1	70	53,3	60,1	8,3
	Réplica 2	56	57,7		
	Réplica 3	43	69,4		
2.666,7	Réplica 1	54	64,0	69,6	7,4
	Réplica 2	44	66,8		
	Réplica 3	31	77,9		
4.000,0	Réplica 1	16	89,3	90,1	1,2
	Réplica 2	14	89,4		
	Réplica 3	12	91,4		
8.000,0	Réplica 1	5	96,7	96,7	0,5
	Réplica 2	5	96,2		
	Réplica 3	4	97,1		
20.000,0	Réplica 1	0	100,0	100,0	0,0
	Réplica 2	0	100,00		
	Réplica 3	0	100,00		

Anexo XVIII. Valores de luminiscencia, porcentaje de extinción, porcentaje de extinción media y desviación típica para las distintas concentraciones de **aceite del árbol del té (*Melaleuca alternifolia*)**.

Muestra ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	Réplicas	Luminiscencia a los 15 minutos	Extinción	Extinción media (%)	Desviación típica
Control	Réplica 1	117	-	0,0	0,0
	Réplica 2	119	-		
	Réplica 3	108	-		
0,1563	Réplica 1	-	-	-	-
	Réplica 2	-	-		
	Réplica 3	-	-		
0,1786	Réplica 1	140	-20,0	-29,1	15,3
	Réplica 2	144	-20,7		
	Réplica 3	159	-46,8		
0,2083	Réplica 1	119	-2,0	-7,7	8,3
	Réplica 2	124	-3,9		
	Réplica 3	127	-17,2		
0,2500	Réplica 1	120	-2,9	-4,9	9,7
	Réplica 2	115	3,6		
	Réplica 3	125	-15,4		
0,2778	Réplica 1	120	-2,9	-1,3	9,3
	Réplica 2	109	8,7		
	Réplica 3	119	-9,8		
0,3125	Réplica 1	106	9,1	5,4	6,8
	Réplica 2	108	9,5		
	Réplica 3	111	-2,5		
0,3571	Réplica 1	69	40,9	41,5	4,6
	Réplica 2	64	46,4		
	Réplica 3	68	37,2		
0,4167	Réplica 1	52	55,4	54,7	8,8
	Réplica 2	44	63,1		
	Réplica 3	59	45,5		
0,5000	Réplica 1	47	59,7	58,9	5,6
	Réplica 2	43	64,0		
	Réplica 3	51	52,9		
0,6250	Réplica 1	40	65,7	65,3	4,8
	Réplica 2	36	69,8		
	Réplica 3	43	60,3		
0,8333	Réplica 1	27	76,9	80,1	4,5
	Réplica 2	26	78,2		
	Réplica 3	16	85,2		
1,0000	Réplica 1	19	83,7	86,1	2,2
	Réplica 2	16	86,6		
	Réplica 3	13	88,0		
1,2500	Réplica 1	11	90,6	90,7	0,9
	Réplica 2	12	89,9		
	Réplica 3	9	91,7		
1,6667	Réplica 1	0	100,0	100,0	0,0
	Réplica 2	0	100,0		
	Réplica 3	0	100,0		
2,5000	Réplica 1	0	100,0	100,0	0,0
	Réplica 2	0	100,00		
	Réplica 3	0	100,00		

Anexo XIX. Valores de luminiscencia, porcentaje de extinción, porcentaje de extinción media y desviación típica para las distintas concentraciones de **aceite de citronella** (*Cymbopogon citratus*).

Muestra ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	Réplicas	Luminiscencia a los 15 minutos	Extinción (%)	Extinción media (%)	Desviación típica
Control	Réplica 1	100	-	0,0	0,0
	Réplica 2	97	-		
	Réplica 3	109	-		
0,1563	Réplica 1	-	-	-	-
	Réplica 2	-	-		
	Réplica 3	193	-76,5		
0,1786	Réplica 1	-	-	-	-
	Réplica 2	-	-		
	Réplica 3	192	-75,6		
0,2083	Réplica 1	-	-	-	-
	Réplica 2	-	-		
	Réplica 3	183	-67,4		
0,2500	Réplica 1	-	-	-55,0	18,9
	Réplica 2	190	-95,9		
	Réplica 3	185	-69,2		
0,2778	Réplica 1	191	-91,6	-69,9	21,3
	Réplica 2	164	-69,1		
	Réplica 3	163	-49,1		
0,3125	Réplica 1	183	-83,6	-43,2	35,5
	Réplica 2	125	-28,9		
	Réplica 3	128	-17,1		
0,3571	Réplica 1	124	-24,4	-13,1	11,0
	Réplica 2	109	-12,4		
	Réplica 3	112	-2,4		
0,4167	Réplica 1	93	6,7	11,6	5,6
	Réplica 2	87	10,3		
	Réplica 3	90	17,7		
0,5000	Réplica 1	71	28,8	20,3	7,5
	Réplica 2	83	14,4		
	Réplica 3	90	17,7		
0,6250	Réplica 1	59	40,8	44,4	3,4
	Réplica 2	51	47,4		
	Réplica 3	60	45,1		
0,8333	Réplica 1	40	59,9	62,1	2,1
	Réplica 2	35	63,9		
	Réplica 3	41	62,5		
1,0000	Réplica 1	33	66,9	67,7	1,2
	Réplica 2	30	69,1		
	Réplica 3	36	67,1		
1,2500	Réplica 1	25	74,9	73,2	1,5
	Réplica 2	27	72,2		
	Réplica 3	30	72,6		
1,6667	Réplica 1	8	92,0	92,2	0,5
	Réplica 2	7	92,8		
	Réplica 3	9	91,8		
2,5000	Réplica 1	0	100,0	100,0	0,0
	Réplica 2	0	100,00		
	Réplica 3	0	100,00		

Anexo XX. Resultados de la inhibición del **ajo**, almacenado durante 1, 3 y 7 días a distintas temperaturas, sobre **V. fischeri**. Los números representan el diámetro medio de los halos de inhibición (expresados en cm).

Dilución	Concentración (mg mL ⁻¹)	63°C			37°C			22°C			4°C		
		Días			Días			Días			Días		
		1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7
N	200	1,4	-	-	2,5	2,2	2,4	2,6	2,7	2,7	2,9	2,6	2,6
1:2	100	1,2	-	-	2,2	1,9	1,8	2,3	2,4	2,3	2,6	2,3	2,3
1:4	50	-	-	-	1,9	1,6	1,5	2	1,9	1,8	2,2	1,8	2
1:8	25	-	-	-	1,4	1,2	NT	1,6	1,7	1,4	1,7	1,6	1,5
1:16	12,5	-	-	-	1,1	1,1	1,1	1,3	1,3	1,5	1,5	1,4	1,3
1:32	6,25	-	-	-	-	-	-	1,1	1,1	1,2	1,1	1,1	1,6
1:64	3,13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-

Anexo XXI. Resultados de la inhibición del **aceite de clavo**, almacenado durante 1, 3 y 7 días a distintas temperaturas, sobre **V. fischeri**. Los números representan el diámetro medio de los halos de inhibición (expresados en cm).

Dilución	Concentración (μL mL ⁻¹)	63°C			37°C			22°C			4°C		
		Días			Días			Días			Días		
		1	3	7	1	3	7	1	3	7	1	3	7
N	500	2,6	2,2	3,3	2,6	2,4	2,5	2,6	2,3	2,6	2,8	2,3	2,7
1:2	250	2,6	2,1	3,2	2,3	2	2,4	2,3	2,1	2,5	2,4	2,1	2,4
1:4	125	2,2	1,9	3	2,1	2	2	2,1	1,9	2,1	2,1	1,9	2,1
1:8	62,5	2	1,7	2,7	2,1	1,7	2	1,8	1,5	1,9	1,7	1,5	2,1
1:16	31,25	1,9	1,8	2,5	2	1,6	1,9	1,7	1,7	2,2	2	1,5	2
1:32	15,63	1,9	1,9	2	2	1,9	2	1,6	1,8	2	1,9	1,6	1,9
1:64	7,81	1,5	1,4	1,2	1,6	1,3	1,5	1,4	1,3	1,6	1,4	1,2	1,4